

**WO 02/34906 A2**



**(81) Bestimmungsstaat (national):** US.

**(84) Bestimmungsstaaten (regional):** europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

**Erklärungen gemäß Regel 4.17:**

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR)

- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

**Veröffentlicht:**

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

## **Verfahren zur Exposition von Peptiden und Polypeptiden auf der Zelloberfläche von Bakterien**

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Präsentation von Peptiden, einschließlich Polypeptiden und Proteinen, je nach Länge der präsentierten Sequenz, auf der Oberfläche gramnegativer Bakterienzellen, insbesondere *Escherichia coli* Zellen, ein zugehöriges Verfahren zur Herstellung einer varianten Population von oberflächenexponierten Peptiden oder Polypeptiden und zur Identifizierung von Bakterien, die Peptide bzw. Polypeptide mit einer jeweils gewünschten Eigenschaft tragen, sowie bei dem Verfahren verwendbare Vektoren und Wirtsbakterien.

Generell erlaubt das Verfahren die Expression von rekombinanten Proteinen, die Rezeptoren oder Liganden sein können, auf der Bakterienoberfläche, sowie die Selektion aufgrund der Bindungsaffinität zu einem Bindungspartner. Das Verfahren erlaubt die Expression von Peptid- und Polypeptidbibliotheken auf der Oberfläche von Bakterienzellen, mit deren Hilfe beispielsweise Peptidmoleküle mit hoher Affinität zu einem Liganden identifiziert werden können. Das Verfahren gestattet die Präsentation einer großen Anzahl von Passagierproteinen bzw. -peptiden auf der Oberfläche einer Bakterienzelle, ohne daß die zelluläre Überlebensfähigkeit dadurch beeinflusst wird. Darüberhinaus ermöglicht dieses Verfahren, die Anzahl der pro Zelle oberflächenpräsentierten Moleküle nach Wunsch einzustellen.

Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung auch die Isolierung von monospezifischen Antikörpern aus polyklonalen Antikörpergemischen durch Bindung an Zelloberflächenverankerte Peptidepitope.

### 25 **Hintergrund**

Gegenwärtig wird die Expression von Proteinen und Proteindomänen auf der Oberfläche von selbstreplizierenden Trägern wie Bakteriophagen, Bakterien, Hefen usw. intensiv untersucht, vor allem mit der Zielsetzung, eine Kopplung der funktionalen Ausprägung einer Eigenschaft des auf dem Träger präsentierten Proteins (Phänotyp) mit der zugrundeliegenden genetischen Kodierung (Genotyp) zu erreichen. Beispiele für erfolgreiche Phänotyp/Genotyp Kopplung finden sich u.a. bei der Verwendung von Hefen als Träger Oberflächen-präsentierter Proteine. So wurde z.B. ein molekulares Repertoire an varianten Hefezellen erzeugt, welche jeweils

verschiedene Immunglobulinfragmente auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Aus dieser Bibliothek von Antikörpervarianten konnten solche isoliert werden, die eine erhöhte Affinität zu einem vorgegebenen Ligandenmolekül aufwiesen (Boder und Wittrup (1997), Nat. Biotechnol. 15: 1553)

- 5 Eine breite Anwendung finden Bakterien bei der Zelloberflächenpräsentation. Es kommen sowohl Gram-negative als auch Gram-positive Arten zur Anwendung. So konnten auf *Staphylococcus xylosus* und *Staphylococcus carnosus* Proteine durch *Staphylococcus aureus* Protein A präsentiert werden. Durch die Fusion an *Staphylococcus aureus* Fibronectin Bindeprotein B (FnBPB) konnten Enzyme auf der Oberfläche von *S. carnosus* verankert werden
- 10 (Strauss und Götz (1996), Mol. Microbiol. 21: 491-500). Gram-positive Bakterien sind jedoch für die Präsentation großer Peptidbibliotheken wenig geeignet, da es schwierig ist, die entsprechenden Genvarianten durch Transformation in die Zellen einzubringen und eine hinreichend große Anzahl unabhängiger und bezüglich der kodierenden Nukleotidsequenz der Oberflächen-präsentierten Proteinvariante unterschiedlicher Klone zu erzeugen.
- 15 Gram-negative Bakterien hingegen sind zur Generierung molekularer Repertoires und der damit einhergehenden Präsentation veränderter Proteine aufgrund der hohen Transformationsausbeute ( $>10^9$  pro Mikrogramm Plasmid DNA bei *E. coli* sehr gut geeignet und daher bevorzugte Wirtsorganismen.

Für die Präsentation rekombinanter Proteine auf der Zelloberfläche Gram-negativer Bakterien

20 wurden verschiedene Systeme beschrieben (Georgiou *et al.* (1997), Nature Biotechnol. 15: 29-34). Eine Oberflächenpräsentation wird im allgemeinen dadurch erreicht, daß Gensegmente eines bakteriellen Oberflächenproteins mit dem Gen des zu präsentierenden Proteins fusioniert werden. Dabei kommen üblicherweise Proteine als Träger zum Einsatz, die ihrerseits sekretiert werden und/oder in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien lokalisiert sind und somit die notwendigen Signale zur Translokation durch die Cytoplasmamembran, die Passage in das bakterielle Periplasma und die Integration in die äußere Membran oder die Verankerung auf der Oberfläche der äußeren Membran beinhalten. Als Trägerproteine kamen bislang zumeist Proteine zum Einsatz, die ihrerseits integrale Bestandteile der äußeren Membran von *E. coli* sind. Dazu gehören unter anderem, PhoE (Agterberg *et al.* (1987),

25 Gene 59: 145-150) oder OmpA (Francisco *et al.* (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 2713-2717), deren Verwendung jedoch Nachteile aufweisen. So können Proteinsequenzen nur in oberflächenexponierten Schleifen dieser Proteine inseriert werden, was zum einen zu konformationell fixierten Amino- und Carboxytermini Anlass gibt und zum anderen die Länge

30

der zu inserierenden Peptidsequenz drastisch einschränkt. Die Verwendung des Peptidoglycan-assoziierten Lipoproteins (PAL) als Trägerprotein führt zwar zum Transport zur äußeren Membran, eine Präsentation aktiver und korrekt gefalteter Proteinsequenzen auf der Oberfläche von *E. coli* ist jedoch nicht möglich (Fuchs *et al.* (1991), Bio. Technology 9, 1369-1372).

- 5 Eine Oberflächenexpression größerer Proteine gelang (a) durch Verwendung einer Fusion aus einem Fragment des *Escherichia coli* Lpp und des OmpA Proteins als Trägerproteinanteil, an deren Carboxy-Ende die Passagierproteinsequenz angehängt wird (Francisco *et al.* (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 2713-2717) (b) durch Verwendung der IgA-Protease  $\beta$ -Domäne (IgA $\beta$ ) und anderer bakterieller Autotransporter (Maurer *et al.* (1997) J. Bacteriol. 179: 794-  
10 804), sowie (c) durch die Verwendung des Eis-Nukleationsproteins von *Pseudomonas syringae* (InaZ) (Jung *et al.* (1998), Nature Biotechnol. 16: 576-580) als Trägerproteinanteil.

Aus den obigen Beispielen wird deutlich, daß eine Präsentation von Proteinen auf der bakteriellen Zelloberfläche dadurch hervorgerufen werden kann, daß eine Passagierdomäne durch Fusion der entsprechenden kodierenden DNA-Sequenz mit der kodierenden Sequenz eines  
15 ausgewählten Proteins der äußeren Membran oder Membranproteinfragments der äußeren Membran an ein Trägerprotein fusioniert wird. Das Membranprotein oder Membranproteinfragment trägt dabei die zur Membranlokalisierung und -verankerung notwendigen Motive. Das Trägerprotein der äußeren Membran sollte dabei (a) ein Sekretionssignal besitzen, das eine Passage durch die Cytoplasmamembran sicherstellt, (b) ein Lokalisationssignal für die  
20 Einbettung in die äußere Membran aufweisen, (c) in möglichst hoher Kopienzahl auf der Zelloberfläche auftreten und (d) die strukturelle und funktionelle Integrität und vor allem die Vitalität der Wirtszelle nicht negativ beeinflussen.

Bei den nach Stand der Technik beschriebenen Verfahren zur Herstellung heterologer Passagierproteine mit Hilfe von Proteinen der äußeren Membran wurden jedoch erhebliche Nach-  
25 teile, vor allem bezüglich der beiden Anforderungen (c) und (d) festgestellt, da eine hohe Expressionsrate und eine hohe Nettoakkumulation in der äußeren Membran stets mit einer hohen Mortalität der präsentierenden Bakterienzellen einhergeht. So ist eine starke Überexpression von Fusionsproteinen mit Lpp-OmpA als Membrananker lethal (Daugherty *et al.* (1999), Protein Eng. 12: 613-21). Eine hohe Zellmortalität wurde ebenfalls für die Verwendung des  
30 Autotransporters der IgA-Protease (IgA $\beta$ ) beschrieben (Wentzel *et al.* (1999), J. Biol. Chem. 274: 21037-21043). Jung *et al.* führten das Eis-Nukleationsprotein aus *Pseudomonas syringae*, das ein Glycosyl-Phosphatidylinositol verankertes Protein der äußeren Membran ist, als Trägerprotein für die Zelloberflächenpräsentation von Passagierproteinen in *E. coli* ein (Jung *et al.* (1998), Nature Biotechnol. 16: 576-580). Dieses Trägerprotein erlaubt zwar die stabile

Präsentation von Passagieren auf der Oberfläche der äußeren Membran, die Fusionsproteine aggregieren jedoch in Clustern auf der bakteriellen Oberfläche, eine Eigenschaft, die für Zwecke der Selektion von Peptiden und Polypeptiden mit hoher Affinität zu einem gegebenen Bindungspartner unerwünscht ist.

- 5 Neben den integralen Proteinen der äußeren Membran wurden noch andere Oberflächenstrukturen, die auf der Zelloberfläche vorhanden sind, wie Flagellen, Pili, Fimbrien u.s.w. als Träger für die Präsentation von Passagierdomänen herangezogen. Durch die Verwendung von Flagellin, einer strukturellen Untereinheit des Flagellums als Träger konnten diverse Peptide des Hepatitis B Virus stabil exprimiert und auf der Bakterienoberfläche exponiert werden
- 10 (Newton *et al.* (1989), Science 244: 70-72). Ebenso wie bei der Verwendung von Fimbrin als strukturellem Trägerprotein bleibt die Präsentation von Passagierdomänen jedoch auf kleine Peptide beschränkt (Hedegaard *et al* (1989), Gene 85: 115-124).

#### **Technisches Problem und dessen Lösung durch die vorliegende Erfindung**

- Der vorliegenden Erfindung lag also das technische Problem zugrunde, Trägerproteine bereitzustellen, die insbesondere bei Verwendung von *Escherichia coli* als Wirtsorganismus nicht zu den oben genannten Nachteilen führen.
- 15

#### **Ein optimales Präsentationsverfahren muß folgende Aufgaben erfüllen:**

1. Das zu präsentierende Peptid/Protein soll vorzugsweise in möglichst hoher Kopienzahl verankert auf der Oberfläche einer Bakterienzellen vorliegen.
- 20 2. Die Überlebensfähigkeit soll durch die Peptid/Protein-Präsentation nicht beeinträchtigt werden.
3. Die Anzahl der pro Zelle oberflächenpräsentierten Peptid/Proteinmoleküle sollte in weiten Grenzen regulierbar sein.

- Ein Verfahren zur bakteriellen Oberflächenpräsentation, welches diese Anforderungen in allen Punkten erfüllt, ist bisher nicht beschrieben worden.
- 25

#### **Zusammenfassung der Erfindung**

- Zur Lösung der vorstehenden Aufgabe ist bei einem Verfahren zur Präsentation von Peptiden und/oder Polypeptiden auf der Oberfläche von Wirtsbakterien vorgesehen, dass man (a) ein grammnegatives Wirtsbakterium bereitstellt, das transformiert ist mit einem Vektor, auf dem
- 30 in operativer Verknüpfung mit einem exogen induzierbaren Promotor eine fusionierte Nukleinsäuresequenz lokalisiert ist, welche: (i) einen Sequenzabschnitt, der ein im carboxyterminalen Bereich um wenigstens die C3-Domäne verkürztes Intimin kodiert, als

Verankerungsdomäne und (ii) einen für das zu präsentierende Passagierpeptid und/oder Passagierpolypeptid kodierenden Nukleinsäuresequenzabschnitt aufweist, und (b) das Wirtsbakterium unter Bedingungen kultiviert, bei denen eine Expression der fusionierten Nukleinsäuresequenz und eine Präsentation des von dem Nukleinsäuresequenzabschnitt (ii) kodierten

5 Peptids oder Polypeptids an der Oberfläche des Wirtsbakteriums erfolgt, wobei der Nukleinsäuresequenzabschnitt (ii) gegenüber dem für die Intimin-Membran-Verankerungsdomäne kodierenden Nukleinsäuresequenzabschnitt heterolog ist.

Das verkürzte Intimin kann im carboxyterminalen Bereich von 280 Aminosäuren um wenigstens eine weitere der Domänen D0, D1 und/oder D2 verkürzt sein (neben der Verkürzung um die D3-Domäne).

10

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Präsentation von Peptiden oder Polypeptiden auf der Oberfläche von gramnegativen Wirtsbakterien mit Hilfe bestimmter Intimin-basierter Verankerungsmodule. Es wurde gefunden, dass sich carboxyterminal verkürzte Intimine besonders gut als Verankerungseinheiten für Passagierdomänen in der äußeren E.coli Zellmembran eignen.

15

Die Erfindung basiert auf der Bereitstellung eines Genkonstruktes, bei dem ein spezielles Trägerprotein (ein Fragment des sog. Intimins s.u.) als Präsentationsanker verwendet wird. Zur Präsentation eines vorgegebenen Peptids/Proteins wird das kodierende Gen an die kodierende Sequenz des Intimin-Genfragments im durchgehenden Leseraster fusioniert und dadurch das resultierende Fusionsprotein in der äußeren Membran verankert präsentiert. Überraschenderweise zeigt sich bei Verwendung eines Intiminfragments als Membrananker, dass eine sehr große Anzahl von Molekülen in der Bakterienmembran bereitgestellt werden kann, ohne daß die Überlebensfähigkeit der Wirtsbakterien dadurch negativ beeinflusst wird. (b) Es ist uns gelungen, durch kombinierte Regulation der Expression des Intimings auf Transkriptions- und Translationsebene die Anzahl der Moleküle pro Zelle nach Wunsch einzustellen. Bisher beschriebene Verfahren zur Regulation der Genexpression zum Zwecke der Einstellung oberflächenpräsentierter Moleküle leisten dies nicht.

20

25

### **Intimin als Präsentationsanker**

30

In Weiterbildung der Erfindung ist vorgesehen, dass die verwendete Intimin-Verankerungsdomäne in der äußeren Bakterienmembran aus der Gattung der Enterobacteria-

ceae abgeleitet wurde und in einem Wirtsbakterium einer Gattung der Enterobacteriaceae verwendet wird. Weiter vorzugsweise ist die Verankerungsdomäne ein Fragment des Intimins aus enterohämorrhagischen *E.coli* oder einer Variante von diesen. Besonders bevorzugt ist derzeit eine carboxyterminal verkürzte Variante des EaeA-Intimins aus enterohämorrhagischen *Escherichia coli* O157:H7, das die Aminosäuren 1 bis 659 oder alternativ die Aminosäuren 1 bis 753 umfasst.

Viele Stämme pathogener Bakterien besitzen Oberflächenstrukturen, wie Pili, Glycoproteine und andere Proteine, ebenso wie homopolymere und heteropolymere Kohlenhydrat-Glycocalices, mit denen sich Bakterien an eukaryontische Zelloberflächen anheften. Proteine der bakteriellen Zelloberfläche, die als **Intimine** bezeichnet werden, spielen eine wichtige Rolle bei der festen Anheftung von enteropathogenen (EPEC) oder enterohämorrhagischen *E. coli* Bakterien (EHEC) an die Oberfläche eukaryontischer Wirtszellen. Die Intimin-vermittelte Anheftung erlaubt den Bakterien eine Vermehrung auf der Oberfläche der besiedelten Zellen. Intimin ist ein Vertreter einer Familie bakterieller Adhäsionsmoleküle, die im Bereich der aminoterminalen Region Sequenzhomologien untereinander aufweisen (McGraw *et al.* (1999), Mol. Biol. Evol. 16: 12-22).

Die Zellbindeaktivität von Intimin, des Genprodukts des Eae Gens, welches 939 Aminosäurereste umfasst, ist in den C-terminalen 280 Aminosäureresten lokalisiert. Intimin ist mit seiner aminoterminalen Domäne in der äußeren Membran verankert, welche die carboxyterminalen 280 Aminosäuren exponiert. Diese 280 Reste kodieren drei Domänen, zwei Immunglobulin-ähnliche Domänen und eine Lektin-ähnliche Domäne (Kelly *et al.* (1999), Nat. Struct. Biol. 6: 313-318), welche für die Bindung an Eukaryontenzellen verantwortlich sind. Die Struktur der Domänen D1, D2, D3 ist bekannt, nicht jedoch die Struktur der aminoterminalen Domäne (Kelly *et al.* (1999), Nat. Struct. Biol. 6: 313-318). Der schematische Aufbau des Intimins und seine Verankerung in der äußeren Membran ist in Abb. 1 dargestellt. Entsprechende Domänen anderer Intimine lassen sich aus Sequenzvergleichen ableiten.

Intimine zeigen mit Ausnahme der aminoterminalen 200 Aminosäurereste Sequenzhomologien zu Invasinen aus Yersinien und anderen Bakterien, welche den Eintritt des Bakteriums in kultivierte Säugerzellen über die Bindung an Integrine ermöglichen (Leong *et al.* (1990), EMBO J. 9: 1979-1989). Integrine und Invasine sind zwar sequenzähnlich, werden aber bezüglich ihrer Funktion verschiedenen Proteinfamilien zugeordnet (Batchelor *et al.* (2000), EMBO J. 19: 2452-2464).



Durch die Verwendung eines Fragments des *Escherichia coli* Intimins als Transporterdomäne für die bakterielle Oberflächenlokalisierung von Passagierproteinen und Passagierpeptiden konnte **überraschenderweise eine gegenüber dem Stand der Technik deutlich verbesserte Oberflächenpräsentation** von Peptiden oder Polypeptiden, insbesondere auch von kurzen  
5 synthetischen Peptiden mit einer Länge von vorzugsweise 6 bis 20 Aminosäuren, von disulfidverbrückten Peptiden und Polypeptiden, insbesondere Oligopeptiden auf der strukturellen Grundlage des Cystinknoten Faltungsmotivs (Pallaghy *et al.* (1994), Protein Sci. 3: 1833-1839) bzw. von bakteriellen (z.B.  $\beta$ -Laktamase-Inhibitorprotein) und eukaryontischen Polypeptiden (z.B. Interleukin 4) erreicht werden.

10 **Identifizierung des Eae Intimins als Trägerprotein für die Oberflächenexposition von Passagierproteinen**

Das bevorzugt verwendete *Escherichia coli* Intimin ist in der äußeren Membran von *Escherichia coli* lokalisiert und exponiert von Natur aus mindestens eine Proteindomäne auf der Außenseite der äußeren Membran. Das *Escherichia coli* Intimin ist in der äußeren Membran  
15 verankert und trägt an seinem carboxyterminalen Ende vier Domänen, die für die Interaktion mit einem Rezeptorprotein auf der Oberfläche von Epithelzellen notwendig sind.

Ausgehend von der Arbeitshypothese, daß eine Substitution mindestens einer der Zelloberflächen-exponierten Intimindomänen durch eine heterologe Passagierdomäne zu einer Oberflächenexposition derselben führt, wurde eine Genfusion aus einem für ein Passagierprotein  
20 und einem für ein Intiminfragment kodierenden Nukleinsäuresequenzabschnitt hergestellt. Die Genfusion aus dem Intiminfragment und der Passagierdomäne, die Vektorkonstruktion und die Expression in Wirktsbakterien im Vergleich zu einem anderen Oberflächen-Präsentationsverfahren sind in Beispiel 1 dargestellt.

Generell wird für die Genfusion das gewählte Intimingen bzw. Genfragment durch Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und in einen für die Expression in dem vorgesehenen Wirtsbakterium geeigneten Vektor kloniert. In denselben Vektor wird stromabwärts von dem  
25 gewählten Intiminfragment in dasselbe Leseraster ein Gen für ein zu präsentierendes Passagierpeptid eingebracht. Der Vektor enthält außerdem einen exogen induzierbaren Promotor in operativer Verknüpfung mit dem Intimingen und dem damit fusionierten Passagierpeptidgen.  
30 Weitere funktionelle Sequenzen, z.B. Markergene, können ebenfalls vorhanden sein.

In Weiterbildung der Erfindung wird das Verfahren so ausgestaltet, dass die Expression des Fusionsgens aus dem für das verkürzte Intimin und dem für das Passagierprotein kodierenden

Nukleinsäuresequenzabschnitt regulierbar ist, wobei (i) ein für ein Glutamin codierendes Codon des für das verkürzte Intimin kodierenden Nukleinsäuresequenzabschnitts durch ein amber Stopcodon (TAG) ersetzt ist und (ii) ein Escherichia coli Wirtstamm verwendet wird, in dem eine Translation der mRNA des Fusionsgens durch Bereitstellung einer regulierbaren Menge an Suppressor-tRNA erfolgt, die ein Überlesen des Stopcodons bei der Translation ermöglicht. Dieses Verfahren ermöglicht eine wirksame Regulation der Expression des präsentierten Abschnitts innerhalb der Wirtszelle und ist bei praktisch allen bekannten Präsentationsverfahren nützlich.

Bei dem weitergebildeten Verfahren wird ein CAG-Codon innerhalb des Intiminfragments gegen ein TAG-Stopcodon ausgetauscht. Dies geschieht beispielsweise durch Klonierung eines PCR-Fragments, wobei das CAG-Codon Nummer #35 im Intimin gegen ein TAG-Stopcodon ausgetauscht wird. Bei Verwendung eines amber Suppressorstammes wird dieses Stopcodon überlesen und an dieser Stelle ein Glutaminrest eingebaut. Da die Effizienz der amber Suppression niedrig ist, werden dadurch weniger Moleküle synthetisiert, als bei Abwesenheit des Stopcodons. Dadurch wird erreicht, dass die Zahl der oberflächenpräsentierten Moleküle in einem für die Zelle tolerablen Umfang bleibt (siehe hierzu Christmann et al. (1999), Protein Eng. 12: 797-806). Als Vektor kann jeder insbesondere zur Expression in E.coli verwendbare Expressionsvektor verwendet werden, als Ausgangsvektor geeignet ist u.a. der Vektor pASK75 (siehe unten).

## **Regulation der Genexpression**

Üblicherweise erfolgt die Regulation der Expression eines Gens dadurch, dass die kodierende Sequenz eines Gens unter die Kontrolle eines Promotors gebracht wird, bei dem die Anzahl der pro Zeiteinheit generierten Transkripte durch die Konzentration eines exogen zugesetzten Induktormoleküls reguliert werden kann. Hierfür kommen z.B. der *lac*-Promotor, der *ara*-Promotor oder der *tetA*-Promotor in Frage (Lutz & Bujard (1997, Nucleic Acids. Res. 25:1203). Eine Regulation der Genexpression mit dem Ziel der Einstellung einer erwünschten Anzahl an Oberflächen-präsentierten Molekülen pro Bakterienzelle durch kontrollierte Induktion der Transkription der Gene von Oberflächen-exponierten Fusionsproteinen ist bisher nicht befriedigend gelungen. Die Variation der Konzentration eines zugesetzten Induktors führte bisher nicht zu einer von der Konzentration des Induktors abhängigen Akkumulation von Fusionsproteinen auf der Oberfläche der Bakterienzelle (Daugherty et al. (1999), Protein Eng. 12: 613-621). Eine geringfügige Verbesserung wurde erzielt durch die Einstellung der Nettoakkumulation über die Induktionszeit. Das bedeutet, dass einer Bakterienkultur der Induktor der Transkription zugesetzt wird, worauf die Zellen verschieden lange mit Induktor

inkubiert werden. Je länger die Induktionszeit ist, umso höher ist die Anzahl der oberflächenpräsentierten Zellen pro Zelle. Dieses Verfahren ist für hochparallele biotechnologische Anwendungen nicht geeignet, da es Probennahmen zu verschiedenen Wachstumszeiten erfordert, außerdem befinden sich die Zellen je nach Wachstumszeit und erreichter optischer Dichte in unterschiedlichen physiologischen Zuständen.

**Das von uns entwickelte Verfahren hebt diese Nachteile auf.** Die Kontrolle der Genexpression erfolgt auf zwei Ebenen, nämlich auf Ebene der Transkription und auf der Ebene der Translation.

In einer erfindungsgemäßen Vorgehensweise werden dazu Fusionsproteine hergestellt, bei denen ein für Glutamin kodierendes Codon (CAG) des für das Intimin oder Intiminfragment kodierenden Nukleinsäuresequenzabschnitts durch ein *amber* Stopcodon (TAG) ersetzt ist. Dieses Codon ist bevorzugt das erste Glutamincodon der Aminosäuresequenz des Intimins oder Intiminfragments. Ebenso kann ein anderes Codon innerhalb der ersten 100 Aminosäuren des Intimins oder Intiminfragments gegen TAG ausgetauscht sein. Es wird nun *in trans* in einem *E. coli* Stamm eine modifizierte Glutaminyl-tRNA angeboten, die den genetischen Marker *supE* trägt. Diese *supE* tRNA ist in der Lage, bei der Translation mit einem TAG-Codon zu paaren und eine Suppression des Translationsstopps herbeizuführen. Erfindungsgemäß ist ein *E. coli* Wirtsbakterium, welches einen das *supE* Gen kodierenden Nukleinsäuresequenzabschnitt in operativer Verknüpfung mit einem regulierbaren Promotor enthält. Bevorzugt ist hierbei der *PLlac-Promotor*, bei dem die Expressionsstärke und damit die Syntheserate von *supE* Transfer-RNA durch die Menge an dem Wachstumsmedium der Wirtsbakterien zugesetzten Induktor IPTG reguliert werden kann. In einem typischen Beispiel ist der Nukleinsäuresequenzabschnitt, welcher für ein *supE* tRNA Gen in operativer Verknüpfung mit einem regulierbaren Promotor kodiert in einem Vektor lokalisiert, welcher zum Expressionsvektor kompatibel ist. Die Transkription des Gens für das Intimin-Passagierdomäne-Fusionsprotein wird durch Zugabe eines Induktors angeschaltet (hier Anhydrotetracyclin). Durch Variation der Menge an IPTG-Induktor werden unterschiedliche und frei einstellbare Mengen an Suppressor tRNA zur Synthese der Intimin-Fusionsproteine in der Zelle zur Verfügung gestellt. Die Menge an bereitgestellter *supE* tRNA determiniert letztlich die Anzahl der durchschnittlich auf der Oberfläche einer Bakterienzelle präsentierten Passagierdomänen. Das neu entwickelte Expressionsverfahren ist in Abb. 5 schematisch dargestellt.

### Ausführungsformen

Beim erfindungsgemäßen Verfahren wird ein Wirtsbakterium bereitgestellt, das mit einem bzw. mehreren kompatiblen Vektoren transformiert ist. Ein solcher Vektor enthält in operativer Verknüpfung mit einem Promotor und gegebenenfalls weiteren für die Expression erforderlichen Sequenzen eine fusionierte Nukleinsäuresequenz. Diese fusionierte Nukleinsäuresequenz umfaßt (a) einen ein Intiminfragment kodierenden Nukleinsäuresequenzabschnitt, welcher eine Präsentation des von Abschnitt (b) kodierten Peptids oder Polypeptids auf der Außenseite der äußeren Membran des Wirtsbakteriums ermöglicht und (b) einen das zu präsentierende Protein und oder Peptid kodierenden Nukleinsäuresequenzabschnitt.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung daher ein Intimin, ein Fragment des Intimins oder ein zu Intimin homologes Trägerprotein, das eine Transporterfunktion ausübt und eine Oberflächenexposition von rekombinanten Proteinen in Wirtsbakterien **in hoher Kopienzahl** ermöglicht. Hierbei handelt es sich um das aminotermi-
- 10 nale Fragment des Eae Intimins aus enterohämorrhagischen *Escherichia coli* Serotyp O157:H7 (Louie *et al.* (1993), 61: 4085-4092), welches von Aminosäure 1 bis 659 reicht. Neben dieser spezifischen Sequenz ist auch die Verwendung von Varianten erfindungsgemäß, die beispielsweise durch Veränderung oder Deletion der Aminosäuresequenz in den nicht für die Translokation durch die Cytoplasmamembran und Lokalisation in der äußeren Membran notwendigen Sequenzabschnitten erzeugt werden können.
- 20 In einem weiteren typischen Beispiel handelt es sich bei dem verwendeten Transporterprotein um das gamma Intimin aus *E. coli* (Genbank Accession Nr. (AF081182), das Intimin aus *E. coli* O111:H- (Genbank Accession Nr. AAC69247) oder Intimin aus anderen *Escherichia coli* Serotypen oder das Intimin aus *Citrobacter freundii* (Genbank Accession Nr. AAA23097). Die DNA Sequenzen und die davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen der zuvor genannten
- 25 Intimine sind an den unten angeführten Stellen als NCBI-Zitate (National Center for Biotechnology Information, U.S.A.) zu finden.

- Weitere Intimindomänen können aus in Datenbanken vorliegenden Proteinsequenzen, aus Proteinsequenzen, die auf in Datenbanken verfügbaren DNA-Sequenzen basieren, oder aus durch Sequenzanalyse direkt oder indirekt über die DNA-Sequenz bestimmten Proteinsequenzen abgeleitet werden. Die entsprechenden kodierenden Regionen (Gene) können zur
- 30 Herstellung von Vektoren oder Fusionsproteingenen, die eine effektive Oberflächenexpression von Passagierproteinen in Gram-negativen Bakterien, insbesondere *Escherichia coli* ermöglichen, verwendet werden.

Oberflächenpräsentation bzw. -exposition bedeutet erfindungsgemäß, dass die Fusionsproteine bzw. Passagierdomänen auf der dem Medium zugewandten Seite der äußeren Bakterienmembran lokalisiert sind. Oberflächenexponierte Passagierproteine sind in intakten Gram-negativen Bakterien frei zugänglich für Bindungspartner.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform ermöglicht die vorliegende Erfindung also die Oberflächenpräsentation von Peptiden oder in einer weiteren Ausführungsform die Oberflächenpräsentation von Peptidbibliotheken in Gram-negativen Bakterien, insbesondere in *E. coli* und deren Verwendung zur Bestimmung der Affinität zu einem Antikörper oder einem anderen Rezeptor.
- 10 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ermöglicht die vorliegende Erfindung die Kartierung von Epitopen und die Isolierung monospezifischer Antikörper aus einem Antikörpergemisch. Epitopkartierung bedeutet, dass das Peptid mit der höchsten Affinität zu einem Antikörper oder einem anderen Rezeptor oberflächenexponiert auf dem produzierenden Stamm identifiziert wird. Dabei wird ein entscheidender Vorteil der vorliegenden Erfindung
- 15 gegenüber für solche Anwendungen verwendeten Phagensystemen (Makowski (1993), Gene 128: 5-11; Kuwabara *et al.* (1997), Nat. Biotechnol. 15: 74-78) zur Expression von Peptidbibliotheken deutlich. In dem erfindungsgemäßen bakteriellen System erfolgt mit der Identifizierung eines die gewünschte Bindungseigenschaft tragenden Peptids gleichzeitig die Selektion des klonalen Produzenten. Dieser kann unmittelbar vermehrt werden. In einem typischen Beispiel werden klonale Nachkommen des Produzenten zur Reinigung bzw. Isolierung
- 20 eines Antikörpers oder eines anderen Rezeptors aus einem Molekülgemisch verwendet. Dies geschieht durch Bindung der Rezeptormoleküle mit hoher Affinität an die auf der bakteriellen Oberfläche exponierten Peptidmoleküle, gefolgt von der Abtrennung der nicht gebundenen Moleküle durch Zentrifugation und/oder Filtration und Ablösen der monospezifischen Antikörper oder Rezeptormoleküle von den oberflächenexponierten Peptiden.
- 25

Mit der Vermehrung des das gewünschte Peptid oder Protein Oberflächen-exponiert exprimierenden Stammes erfolgt eine Amplifikation des entsprechenden kodierenden Gens, dessen Sequenzanalyse eine eindeutige und einfache Identifizierung und Charakterisierung des Peptids oder Proteins erlaubt. Eine so hergestellte Peptidbibliothek enthält also Fusionsproteine, zusammengesetzt aus einem Intimin oder einem Intiminfragment und einem Peptid

30 oder Protein, welches in einem Gram-negativen Bakterium, bevorzugt *E. coli* Oberflächenexponiert produziert wird. In einem typischen Beispiel wird durch Klonierung von an ausgewählten Positionen degenerierten, synthetischen Oligonukleotiden hinter die kodierende

Sequenz des Intimins oder Intiminfragments die hohe Varianz der verschiedenen exprimierten Proteine erreicht.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren die Oberflächenexpression und die Variation eines Peptids oder Polypeptids mit einer Affinität zu einem Bindungspartner, einem Liganden, einem Rezeptor, einem Antigen, einem Protein mit enzymatischer Aktivität, einem Antikörper oder einer Antigen-bindenden Domäne eines Antikörpers.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung einer varianten Population von oberflächenexponierten Peptiden und zur Identifizierung von Bakterien, die Peptide oder Polypeptide mit einer gewünschten Eigenschaft tragen, gliedert sich in folgende Schritte:

- 1) Herstellung mindestens eines Fusionsgens durch Klonierung der kodierenden Sequenz eines gewünschten Passagiers im durchgehenden Leseraster stromabwärts eines Intimins oder Intimingenfragments in mindestens einen Vektor.
- 2) Variieren des Passagiers durch Klonierung von Passagieren aus einem Gengemisch oder durch ortsgerichtete Mutagenese, z.B. durch Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Oligonukleotiden mit gezielt ausgetauschten Basen, durch Zufallsmutagenese unter Verwendung von Oligonukleotidgemischen mit zufallsmäßig erzeugten Basenabfolgen in ausgewählten Sequenzabschnitten in der PCR, durch error-prone PCR, durch zufallsgesteuerte chemische Mutagenese oder durch Verwendung energiereicher Strahlung.
- 3) Einbringen des Vektors oder der Vektoren in Wirtsbakterien.
- 4) Exprimieren des Fusionsgens in den Wirtsbakterien, die dann das Fusionsprotein stabil auf ihrer Oberfläche exprimieren.
- 5) Kultivieren der Bakterien in Flüssigkultur oder auf Agarplatten zur klonalen Expansion.
- 6) gegebenenfalls Selektionieren der Bakterien, die den Passagier mit den gewünschten Eigenschaften tragen und
- 7) gegebenenfalls die Charakterisierung des selektionierten Passagiers durch Sequenzierung des das Passagierpeptid oder -Polypeptid encodierenden Nukleinsäuresequenzabschnitts und
- 8) gegebenenfalls die Isolierung und Reinigung eines Bindungspartners für den Passagier mit den optimalen Eigenschaften.

Dabei kann dieses Verfahren mehrmals durchlaufen werden.

Die Isolierung der Bakterien mit einem stabil exponierten Fusionsprotein mit den gewünschten Eigenschaften erfolgt in einer bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens durch Bindung an einen immobilisierten oder/und markierten Bindungspartner, z.B. einen

5 Matrix-fixierten Bindungspartner, einen Magnetpartikel-markierten Bindungspartner oder einen chromogen oder fluorogen markierten Bindungspartner.

### **Bakterielle Oberflächenpräsentation von Proteinfragmenten, Epitopkartierung und Isolierung monospezifischer Antikörper**

10 Jedes Protein trägt viele antigene Determinanten auf seiner Oberfläche. Daher wird die Immunantwort auf ein solches Molekül immer in der Stimulierung vieler B-Lymphozyten und der Produktion ebenso vieler Antikörperspezies bestehen. Für die immunologische Forschung ist die Kenntnis der Aminosäuresequenz solcher Epitope von großer Bedeutung.

Für viele Anwendungen wäre es von Vorteil, wenn man nach der Kartierung von Epitopen

15 direkt große Mengen monospezifischer Antikörper aus dem kartierten Serum gewinnen könnte. Monospezifische Antikörper sind monoklonal in ihren Eigenschaften gleichwertig und werden auch kommerziell vertrieben. Um solche Antikörper zu isolieren, müssen die Peptide, die das Epitop umfassen, an eine Matrix gekoppelt werden. Danach wird das Serum über diese Matrix geleitet, und anschließend werden die spezifisch an das gewünschte Anti-

20 gen bindenden Antikörper eluiert. In diesem Beispiel der Anwendung der Intimin-basierten bakteriellen Oberflächenpräsentation wurden Epitop-präsentierende *E. coli* Zellen als eine solche Matrix eingesetzt.

Eine Übersicht zur Vorgehensweise bei der Kartierung von Epitopen mittels Intimin-vermittelter Zelloberflächenpräsentation ist in Abb. 9 gezeigt. Die Anwendung dieses Ver-

25 fahrens ist in Beispiel 2 dargestellt.

### **Isolierung von Peptiden mit Affinität zu einem vorgegebenen Zielprotein durch Intimin-basierte Oberflächenpräsentation kombinatorischer Peptidbibliotheken**

Um zu überprüfen, ob Intimin-basierte bakterielle Oberflächenpräsentation dazu geeignet ist, aus einem molekularen Repertoire von Oberflächen-präsentierten Peptidvarianten solche mit

30 Affinität zu einem vorgegebenen Zielprotein zu isolieren, wurde eine Bibliothek von Varianten des 28 Aminosäuren umfassenden Cystinknoten-Proteins EETI-II generiert. EETI-II ist ein im Kürbisgewächs *Ecballium elaterium* vorkommender Inhibitor von Trypsinproteasen. Dieses Peptid wird durch drei intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert, die eine Reihe von

Oberflächenschleifen aufspannen (beschrieben in Wentzel *et al.* (1999), J. Biol. Chem. 274: 21037-21043). Es wurde eine Bibliothek von EETI-II Varianten generiert, bei der die Lösungsmittel-exponierten Reste zweier Schleifenregionen randomisiert sind. Die experimentelle Durchführung dieses Ausführungsbeispiels ist in Beispiel 3 dargestellt.

- 5 Die Erfindung wird im folgenden anhand einiger experimenteller Beispiele näher erläutert, die das Verständnis der Erfindung erleichtern, jedoch nicht zur Beschränkung der Erfindung auf diese Beispiele dienen sollen. Der Fachmann wird selbst erkennen, welche Alternativen auf Basis dieser Beispiele im Rahmen der Erfindung möglich sind.



**Kurze Beschreibung der Figuren:**

Zur Erläuterung der Erfindung dienen ferner die beigegefügt Figuren. Im einzelnen zeigen:

- 5      Figur 1:      Schematische Darstellung des Aufbaus eines Intimins. OM: Outer Membrane. D0 bis D3: extrazelluläre Domänen 1 bis 4. Dem hier bevorzugten Intiminfragment, welches als Träger für Passagierdomänen dient, fehlen die Domänen D2 und D3.
- 10      Figur 2:      Schematische Darstellung des Expressionsvektors pASK-INT-EETI-CK<sup>Send</sup>. Intimin: Kodierende Sequenz für das Intimingenfragment, etag: Kodierende Sequenz für eine Epitopsequenz (Etag); eeti: kodierende Sequenz für das EETI-II Mikroprotein; cat: Gen für Chloramphenicolacetyltransferase; tetR: Gen für Tet-Repressor; bla: Gen für  $\beta$ -Laktamase.
- 15      Figur 3:      Durchflußzytometrische Analyse der bakteriellen Oberflächenpräsentation eines Intimin-EETI-II Mikroprotein Fusionsproteins.
- 20      Figur 4:      Überlebensraten von *E. coli* Zellen, die mittels des Intiminmembranankers ein Mikroprotein auf der bakteriellen Zelloberfläche präsentieren.
- 25      Figur 5:      Schematische Darstellung der Kontrolle der Genexpression durch supE-vermittelte Translationskontrolle.
- 30      Figur 6a:      Nukleotidsequenz und genetische Organisation des durch die PCR-Primer SupE2-Eco-up und SupE2-Mlu-lo amplifizierten Sequenzabschnitts des *E. coli* Genoms aus BMH71-18. Die tRNA-codierenden Gene sind durch Fettdruck hervorgehoben.
- 35      Figur 6b:      Schematische Darstellung des Vektors pZA22-MCS1 (Lutz & Bujard (1997), Nucleic Acids. Res. 25:1203) und des aus dem Einbringen des supE-Gens resultierenden Vektors pZA22-supE.. PL-lac-O1: Hybride Operator/Promotorregion aus PL-Operator und lac-Promotor; RBS: Ribosomale Bindungsstelle. MCS-1: Polylinkersequenz. P15A: Replikationsursprung; KanR: Kanamycinresistenzgen.
- 40      Figur 7:      Schematische Darstellung des Vektors pREP4-supE. Plac-supE: Hybride Operator/Promotorregion aus PL-Operator und lac-Promotor (Lutz & Bujard, (1997) Nucleic Acids. Res. 25: 1203) gefolgt von einem das *supE* Gen enthaltenden Sequenzabschnitt. P15A: Replikationsursprung; KanR: Kanamycinresistenzgen, lacI: Gen für den *lac*-Repressor.

Figur 8: Regulation der Synthese und Oberflächenpräsentation von Intimin-verankerten Passagierdomänen durch kontrollierte Bereitstellung von supE-tRNA.

Figur 9: Vorgehensweise bei der Kartierung linearer Peptid epitope

5

Figur 10: Darstellung der beiden Linkermoleküle resultierend aus der Hybridisierung von 4 Oligonukleotiden, die die entsprechenden Vektorschnittstellen (*AvaI/BamHI*) generieren.

10 Figur 11 Lage der identifizierten Epitope in der Proteinsequenz von PMS1

Figur 12: A) PMS1\_KL6 markiert mit gereinigten Antikörpern gegen Klon 7 (1) und mit gereinigten Antikörpern gegen sein eigenes Epitop (2); B) PMS1\_KL7 markiert mit gereinigten Antikörpern gegen Klon 6 (1) und mit gereinigten Antikörpern gegen sein eigenes Epitop (2).

15

Figur 13: Aminosäuresequenz des Repertoires an EETI-II Varianten. Aminosäuren im 1-Buchstabencode. In kursiv sind die beiden Schleifenregionen eingezeichnet, in denen Aminosäurepositionen (X) randomisiert wurden

20

Figur 14: Anreicherung von Mikroproteinen, die anti- $\beta$ -Laktamase Antikörper binden. Die Zellen wurden jeweils wie im Text beschrieben mit anti- $\beta$ -Laktamase Antikörper markiert. A) Unselektierte Bibliothek markiert mit anti- $\beta$ -Laktamase Serum, anti-Kaninchenantikörper (Biotin Konjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin; in das angelegte Fenster (Fluoreszenzkanal 300-1024) fallen 1,6 % der Zellen. B) zweite Runde der Sortierung (Markierung wie A); C) dritte Runde (Markierung wie A).

25

Figur 15: Aminosäuresequenz der 6 EETI-Varianten die mit dem anti- $\beta$ -Laktamase Antikörper interagieren; randomisierte Aminosäuren sind grau unterlegt, unterstrichene weisen eine Mutation in der DNA-Sequenz gegenüber dem Wildtyp-Gen auf. Für die hintere Schleifenregion zeichnet sich eine Konsensussequenz für die Bindung an den Anti- $\beta$ -Laktamase Antikörper ab.

30

35

## Beispiele

### Beispiel 1: Genfusion aus einem für ein Passagierprotein und einem für ein Intimin-fragment kodierenden Nukleinsäuresequenzabschnitt Vektorkonstruktion und Vergleichsbeispiel

Als Passagier wurde für ein erstes Beispiel das Cystinknotenpolypeptid EETI-II, ein 28 Aminosäurereste umfassender Inhibitor von Trypsinproteasen ausgewählt (wie schon verwendet bei: Wentzel *et al.* (1999), J. Biol. Chem. 274: 21037-21043; Christmann *et al.* (1999), Protein Eng. 12: 797-806).

- 10 Hierzu wurde das Intimingen *eae* (Genbank Accession Z11541) aus EHEC O157:H7 Stamm 933 Bakterien mit Hilfe der Oligonukleotide Intiminup und Intiminlo mittels Polymerase Kettenreaktion amplifiziert. Als Templat wurden durch Kochen inaktivierte EHEC O157:H7 Bakterien eingesetzt. Das Gen wurde amplifiziert mit folgenden Amplifikationsbedingungen: 30 s 94 °C, 30 s 53 °C und 2 min 72 °C, 30 Zyklen.
- 15 Das Oligonukleotid Intiminup hybridisiert von Nukleotid 69 bis 88 des *eae* Gens. Dieser Sequenzabschnitt beinhaltet das ATG Startcodon, sowie die stromabwärts liegenden 17 Nukleotide. Dieses Oligonukleotid enthält 5' zusätzliche Sequenzen, die eine Klonierung des PCR-Produktes 5'-seitig in die *Xba*I Schnittstelle des Vektors pASK21TE-EETI-CK<sup>Send</sup> (Christmann *et al.* (1999), Protein Eng. 12: 797-806). Das Oligonukleotid Intilo1 hybridisiert
- 20 von Nukleotid 2028 bis 2045 des *eae* Gens und enthält 5'-seitig die codierende Sequenz für eine *Mlu*I Schnittstelle, welche die Klonierung 3' seitig in die *Eco*RI Schnittstelle des Vektors pAsk21-EETI erlaubt. Das PCR-Produkt enthält somit die kodierende Nukleinsäuresequenz für die Codone 1 bis 659 des Intimins. Im resultierenden Vektor pASK-Inti-EETI ist somit in operativer Verknüpfung mit dem *tetA* Promotor/Operator ein tripartites Fusionsgen
- 25 lokalisiert, welches besteht aus (a) der codierenden Nukleinsäuresequenz für Intimin von Codon 1 bis 659, (b) der kodierenden Nukleinsäuresequenz für ein 17 Aminosäuren umfassendes Epitop aus dem humanen Gla Protein (Etag; Kiefer *et al.* (1990), Nucleic Acids Res. 18: 1909) und (c) der kodierenden Nukleinsäuresequenz für das Cystinknotenpolypeptid EETI-CK<sup>Send</sup> (Christmann *et al.* (1999), Protein Eng. 12: 797-806); Abb. 2).
- 30 Durch Klonierung eines PCR-Fragments wurde das CAG-Codon Nummer #35 in Intimin gegen ein TAG-Stopcodon ausgetauscht.

Um das Expressionslevel mit bisherigen Verfahren zur Oberflächenpräsentation vergleichen zu können, wurde ein zweites Plasmid herangezogen (pASK21TE-EETI-CK<sup>Send</sup>), bei dem die Intiminsequenz durch ein verkürztes OmpA-Fragment ersetzt ist (Christmann *et al.* (1999), Protein Eng. 12: 797-806).

- 5 Als Bakterienstamm für die Genexpression wurde der Stamm BMH71-18 verwendet (Christmann *et al.* (1999), Protein Eng. 12: 797-806).

**BMH71-18:** [F' *lacI*<sup>q</sup> *lacZ*ΔM15, *proA*<sup>+</sup>*B*<sup>+</sup>; Δ(*lac-proAB*), *supE*, *thi*]

- Die transformierten Zellen wurden bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,2 bis 0,4 anwachsen lassen. Die Expression des Fusionsgens wurde durch Zugabe von 0,2 µg/ml Anhydrotetracyclin induziert. Die Oberflächenpräsentation wurde über die Bindung eines monoklonalen Anti-Etag-Antikörpers an die Oberfläche der Zellen über eine indirekte Fluoreszenzmarkierung nachgewiesen. Hierfür wurden die Zellen nach einer Stunde Inkubation abzentrifugiert und genau wie bei Christmann *et al.* (1999), Protein Eng. 12: 797-806) beschrieben sukzessive mit monoklonalem Anti-E-tag Antikörper, biotinyliertem Anti-Maus-Antikörper und mit Streptavidin, Phycoerythrin-Konjugat inkubiert. Die markierten Zellen wurden im Durchflußzytometer vermessen (Abb. 3). Das FACS-Diagramm zeigt die Fluoreszenz von Zellen, die kein Fusionsprotein produzieren (Negativkontrolle, A), solchen die das Intimin-Etag-EETI Fusionsprotein produzieren (B) und zum Vergleich von solchen Zellen, die mit einem Plasmid transformiert sind, bei dem der Intimin-Membrananker durch einen dem bisherigen Sder Technik entsprechenden 1pp-OmpA Membrananker ersetzt ist (C).

- Wie aus dieser Abbildung zu entnehmen ist, zeigen die Zellen, bei denen eine Intimin-vermittelte Präsentation des Fusionspartners stattfindet eine ca. 10-fach höhere Fluoreszenz als die Zellen mit herkömmlichem Membrananker. **Dieser Befund zeigte überraschenderweise, dass durch Einsatz des Intimin-Membranankers ca. 10 mal mehr Moleküle des Passagierproteins auf der Bakterienoberfläche zur Verfügung stehen. Darüberhinaus wird die Überlebensfähigkeit der Zellen, die bei bisher beschriebenen Verfahren der Überpression von membranverankerten Passagierproteinen stark abnimmt, durch die Überproduktion des Fusionsproteins aus Intiminfragment und Passagierdomäne nicht nennenswert beeinträchtigt.** Nachfolgend ist die Überlebensrate der Zellen vor und 1, 2 und 4 Stunden nach Induktion der Expressions des Fusionsproteins gezeigt (Abb. 4).

### Kombinierte Verwendung von *supE* tRNA in Wirtsorganismen und *amber* Stopcodon im Intiminfragment

Durch Klonierung eines PCR-Fragments wurde das CAG-Codon Nummer #35 in Intimin gegen ein TAG-Stopcodon ausgetauscht. Bei Verwendung eines *amber* Suppressorstammes wird dieses Stopcodon überlesen und an dieser Stelle ein Glutaminrest eingebaut. Da die Effizienz der *amber* Suppression niedrig ist, werden dadurch weniger Moleküle synthetisiert, als bei Abwesenheit des Stopcodons. Dadurch wird sichergestellt, dass die Zahl der oberflächenpräsentierten Moleküle in einem für die Zelle tolerablen Umfang bleibt (siehe hierzu Christmann *et al.* (1999), Protein Eng. 12: 797-806). Die Nukleotidsequenz des 5'-terminalen und des 3'-terminalen Teils des Intimins im Expressionsvektors pASK-INT-EETI-CK<sup>send</sup> ist in Abb. 2 dargestellt, das *amber* Stopcodon #35 ist dabei durch Fettdruck hervorgehoben.

Um das *supE* zu erhalten, wurde der *amber* Suppressor Stamm BMH71-18 als PCR Templat verwendet.

**BMH71-18:** [F' *lacI*<sup>q</sup> *lacZ*ΔM15, *proA*<sup>+</sup>*B*<sup>+</sup>; Δ(*lac-proAB*), *supE*, *thi*]

Das Gen wurde unter Verwendung der Primer SupE2-Eco-up und SupE2-Mlu-lo unter Standardbedingungen aus dem Genom amplifiziert. Die Sequenz des Genomabschnitts und die Primer sind in Abbildung 6a eingezeichnet.

Zur Amplifikation wurden die beiden PCR-Primer supE2-Eco-up und SupE2-Mlu-lo verwendet. Das *supE*-Gen liegt in einem Cluster von tRNA-Genen, die polycistronisch transkribiert und anschließend durch spezifische RNAsen prozessiert und freigesetzt werden. Mit diesen Oligonukleotiden wird das *supE*-Gen und jeweils stromaufwärts und stromabwärts mindestens ein zusätzliches tRNA-Gen amplifiziert. Außerdem führen die Primer eine *EcoRI*- und eine *MluI* Schnittstelle ein. Der resultierende DNA-Abschnitt wurde mit *EcoRI* und *MluI* gespalten und in den mit *EcoRI* und *MluI* gespaltenen Vektor PZA22-MCS1 (Lutz & Bujard (1997), Nucleic Acids. Res. 25:1203) gebracht, wie in Abb. 6b dargestellt.

In diesem Vektor befindet sich der das *supE*-Gen enkodierende Sequenzabschnitt nunmehr unter der Kontrolle des mit IPTG induzierbaren *PLlacO-1* Promotor/Operators MCS1 (Lutz & Bujard, Nucleic Acids. Res. 1997, 25:1203). Der Promotor/Operator und der stromabwärts liegende *supE*-Gensequenzabschnitt wurde durch Spaltung des resultierenden Plasmids mit *XhoI* und *XbaI* entnommen. Die Enden wurden mit T4-Polymerase in Gegenwart von dATP, dGTP, dCTP und dTTP aufgefüllt. Das resultierende Fragment wurde in den mit *SmaI* gespaltenen Vektor pRep4 (Qiagen) eingesetzt. Eine schematische Karte des resultierenden Vektors ist in Abb. 7 gezeigt.

Von pREP4-supE kann durch IPTG-Induktion die Transkription des *supE*-Gens und damit die Bildung von supE-tRNA induziert und durch Variation der Menge an Induktor auch gesteuert werden. Zum Nachweis der Regulierbarkeit der Expression oberflächenpräsentierter Proteine wurde das Plasmid pREP4-supE in den *E. coli* Stamm WK6 [(*lac-proAB*), *thi*, *rpsL*, *nal<sup>r</sup>*; *F'**lacI<sup>q</sup>*, *lacZM15*, *proA+B+*] eingebracht. Dieser Stamm besitzt kein chromosomal kodiertes *supE*-Gen. Zusätzlich wurde der Stamm mit dem Expressionsplasmid pASK-INT-EETI-CK<sup>Send</sup> (s.o.) transformiert. Der nunmehr mit zwei Plasmiden transformierte *E. coli* Stamm wurde in Parallelansätzen in Gegenwart steigender Mengen an IPTG angezogen (0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 1000  $\mu$ M). Bei Erreichen einer Optischen Dichte von 0,2 wurde 0,2  $\mu$ g/ml Anhydrazyklin zur Induktion der Transkription des Intimingens zugegeben. Nach einer Stunde Induktion wurden die Zellen geerntet. Die Zellen wurden sukzessive mit Anti-Etag Antikörper, biotinyliertem Ziegen-Anti-Maus Antikörper und schließlich mit Phycoerythrin gekoppeltem Streptavidin markiert (siehe oben). Die pro Zelle dadurch hervorgerufene Fluoreszenz ist dabei proportional zur Anzahl der auf der Oberfläche der Zelle präsentierten Intiminfusionsproteine. Die zelluläre Fluoreszenz wurde durchflußcytometrisch bestimmt. Wie aus Abb. 8 hervorgeht, ist die Intensität der Fluoreszenz pro Zelle – und damit die Anzahl der präsentierten Moleküle – direkt mit der Menge an IPTG-Induktor korreliert und kann in weiten Bereichen moduliert werden.

## Beispiel 2: Bakterielle Oberflächenpräsentation von Proteinfragmenten, Epitopkartierung und Isolierung monospezifischer Antikörper

Das Gen für PMS1 aus der Hefe *S. cerevisiae* (Genbank Accession Nr. M29688) wurde als Modellantigen verwendet. Das Gen (2.7 kB) wurde mit Hilfe der PCR-Primer PMS1up und PMS1lo aus *S. cerevisiae* amplifiziert. Die DNA wurde mit dem Nukleotrap-PCR Kit (Machery und Nagel) aufgereinigt. Der DNase I Verdau wurde in vier verschiedenen Ansätzen mit  $1,8 \cdot 10^{-2}$ ,  $2,7 \cdot 10^{-2}$ ,  $3,6 \cdot 10^{-2}$  und 0,18 u DNaseI in Gegenwart von 2mM  $MnCl_2$  durchgeführt. Pro Ansatz wurden 5  $\mu$ g DNA eingesetzt. Die Restriktionsspaltung wurde nach 10 min bei RT durch Zugabe von 500 mM EDTA abgestoppt. Die entstandenen Fragmente wurden nach Anfärben mit Ethidiumbromid auf einem 12,5 %igen Polycrylamidgel aufgetrennt. Es wurden Fragmente im Größenbereich von 40-100 bp ausgeschnitten. Anschließend wurden die Fragmente aus dem Gel über Nacht in TBE-Puffer durch Diffusion eluiert. Anschließend wurde möglicherweise noch vorhandene DNase I mittels Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanolfällung der DNA entfernt. Daraufhin wurden überhängende Enden mit T4-DNA-Polymerase in Gegenwart von dATP, dCTP, dGTP und dTTP aufgefüllt. Dann wurden Oli-

gonukleotidhybridlinker (s. Abb. 10) anligiert (2,5 molarer Überschuß 16 h 15 °C) und die Ligationsprodukte erneut über ein 12,5 %iges Acrylamidgel aufgereinigt.

Die Elutionsbedingungen waren die gleichen wie bei der Aufreinigung der Genfragmente. Anschließend wurde die DNA erneut Phenol/Chloroform extrahiert und gefällt. Der Klonierungsvektor pASK-INT-EETI-CK<sup>Send</sup> wurde mit *AvaI/BamHI* gespalten und durch Sucro-  
segradientendichtezentrifugation gereinigt (Kolmar, H. & Fritz, H.-J. (1995). Oligonucleo-  
tide-directed mutagenesis with single-stranded cloning vectors. In: DNA Cloning 1: A practi-  
cal approach. D. Glover, B. D. Hames (Eds.). IRL Press, Oxford, pp. 193-224). Insgesamt  
wurden pro Genbank 230 ng gespaltenen Vektor mit der fragmentierten DNA ligiert und  
damit elektrokompente BMH 71-18 Zellen transformiert. Es wurde ein Repertoire von  
7,2\*10<sup>4</sup> unabhängigen Klonen erhalten. Die Population von Bakterienzellen wurde nach In-  
duktion der Expression des Intimin-Fusionsgens durch Zugabe von Anhydrotetrazyklin mit  
polyklonalem Anti-PMS1 Kaninchenserum inkubiert. Die spezifische Bindung von Antikör-  
pern an Epitop-tragenden Zellen wurde durch Markierung mit biotinyliertem Anti-  
Kaninchen-Antikörper und Inkubation mit Streptavidin-Phycoerythrin Konjugat nachgewie-  
sen. Fluoreszenz-markierte Zellen wurde durch FACS sortiert und mit Hilfe eines MoFlo  
Cellsorters (Cytomation) einzeln auf einer Agarplatte abgelegt. Von einer Anzahl von Klonen  
wurde DNA präpariert und die Nukleotidsequenz von vier klonierten PMS1-Genfragmenten  
bestimmt. Die DNA-Sequenz der Klonen umfaßte die Basen 259-330 (PMS1\_KL3), 1630-  
1672 (PMS1\_KL6), 1786-1856 (PMS1\_KL7) und 2590-2639 (PMS1\_KL10) des *pms1* Gens  
(insgesamt 2715 bp). In Abb. 11 ist die Position dieser Epitope in der Peptidsequenz des  
PMS1-Proteins, sowie die translatierte Aminosäuresequenz des klonierten PMS1 Sequenzab-  
schnitts angegeben.

Von den Klonen PMS\_KL6 und PMS\_KL7 wurden Kulturen im 50 ml Maßstab angezogen.  
Nach einer Stunde Induktion durch Zugabe von Anhydrotetrazyklin (0,2 µg/ml) bei einer op-  
tischen Dichte von 0,2 wurden die Zellen pelletiert, mit PBS-Puffer gewaschen und in 500 µl  
PBS resuspendiert. Anschließend wurde zu diesen Bakterien je 200 µl PMS1 Serum gegeben  
und die Suspension für 45 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert  
und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 200 µl Glycin/NaCl (0,2 M Glycin,  
0,14 M NaCl, pH 2,0) resuspendiert und für 45 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation  
wurden die Bakterien abzentrifugiert und der Überstand durch Zugabe von 100 µl 1 M  
Tris/HCl pH9 alkalisiert. Mit den so gewonnenen monospezifischen Antikörpern wurden die

Zellen von Klon KL6 bzw. KL7 inkubiert (s. Abb. 12).

Damit ist gezeigt, dass mit diesem Verfahren monospezifische Antikörper isoliert werden  
5 können.

### **Beispiel 3: Isolierung von Peptiden mit Affinität zu einem vorgegebenen Zielprotein durch Intimin-basierte Oberflächenpräsentation kombinatorischer Peptidbibliotheken**

10 Es wurde eine Bibliothek von Varianten des 28 Aminosäuren umfassenden Cystinknoten-Proteins EETI-II generiert. EETI-II ist ein im Kürbisgewächs *Ecballium elaterium* vorkommender Inhibitor von Trypsinproteasen. Dieses Peptid wird durch drei intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert, die eine Reihe von Oberflächenschleifen aufspannen (beschrieben in Wentzel *et al.* (1999), J. Biol. Chem. 274: 21037-21043). Es wurde eine Bibliothek von  
15 EETI-II Varianten generiert, bei der die Lösungsmittel-exponierten Reste zweier Schleifenregionen randomisiert sind. Die Aminosäuresequenz des EETI-II Repertoires ist:  
GCXXXXMRCKQDSDCLAGCVCQVLXPXXSXCG

(Aminosäuren im 1-Buchstabencode. In kursiv sind die beiden Schleifenregionen eingezeichnet, in denen Aminosäurepositionen (X) randomisiert wurden)

20 Die randomisierten *eti*-Gene wurden mittels PCR generiert. Als Templat wurde ein *eti*-ck<sup>send</sup> Gen (siehe oben) eingesetzt. Dieses wurde mit Hilfe der degenerierten Primer *eti*\_4+4up und *eti*\_4+4lo amplifiziert. Die Randomisierung der entsprechenden Codone in der Primersequenz erfolgte nach dem Muster NNS, wobei N jedes der vier Nucleotide und S G oder C darstellt. Durch diese Wahl wurden die Stopcodone *ochre* (TAA) und *opal* (TGA) ausgeschlossen und  
25 die Zahl der möglichen Codone von 64 auf 32, die aber noch für alle Aminosäuren kodieren, reduziert. Das Gemisch resultierender PCR-Produkte wurde mit *Ava*I und *Bam*HI geschnitten und mit dem *Ava*I/*Bam*HI gespaltenen pASK-INT-EETI-CK<sup>Send</sup> Vektorfragment ligiert.

Als Klonierungsvektor diente der pASK-INT-EETI-CK<sup>send</sup> (s. Abb. 8). Dieser Vektor wurde mit *Ava*I und *Bam*HI geschnitten. Anschließend wurde das Vektorfragment mittels Sucro-  
30 segradientendichtezentrifugation von der Vektor DNA abgetrennt. Die durch PCR mit degenerierten Primern generierten *eti*4+4 Gene wurden mit dem gereinigten Vektor ligiert und mit diesem Ansatz der *E. coli* Stamm DH5α (Hanahn, D. (1983), J. Mol. Biol. 166: 557-580) transformiert. Es wurden 16 Transformationen parallel durchgeführt. Alle Transformanten



wurden auf Chloramphenicol-haltige Selektivplatten (25 µg/ml) ausgestrichen. Nach Inkubation für ca. 20 Stunden bei 37 °C wurden die Kolonien abgeschwemmt und die Zellen nach Zugabe von DMSO (7% v/v) in Aliquots bei –80 °C gelagert. Insgesamt wurden so  $2 \cdot 10^7$  unabhängige Klone erzeugt.

- 5 Zur Isolierung von Mikroproteinen mit Affinität zu Anti-β-Laktamaseantikörpern wurde eine Flüssigkultur von 50 ml mit  $10^9$  Zellen der gelagerten Bibliothek angeimpft. Bei Erreichen einer optischen Dichte von 0,4 wurde Anhydrotetrazyklin zur Induktion der Genexpression zugegeben (0,2 µg/ml). Nach der Induktion wurden die Zellen Fluoreszenz-markiert. Dazu wurden sie zuerst für 10 min Anti-β-Laktamase-Antikörper inkubiert, anschließend mit PBS
- 10 gewaschen, um nicht gebundenes Protein zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit biotinyliertem Anti-Kaninchenantikörper und dann mit Streptavidin-gekoppeltem R-Phycoerythrin inkubiert. Nach der Markierung wurden die Zellen im Cellsorter analysiert und fluoreszierende Zellen aussortiert. Als fluoreszierend wurden solche Bakterien definiert, die in einen Fluoreszenzkanal zwischen 300-1024 fielen (s. Abb. 14).
- 15 Aussortierte Zellen wurden auf Chloramphenicol-haltige (25 µg/ml) Agarplatten plattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Kolonien abgeschwemmt und als DMSO-Kultur bei –80 °C gelagert. Ein Aliquot wurde verwendet, um eine frische 50 ml Kultur zu beimpfen.
- 20 In der ersten Runde wurden insgesamt  $2 \cdot 10^8$  Zellen analysiert und solche, die in den entsprechenden Fluoreszenzkanal (300-1024) fielen, wurden aussortiert. In der zweiten Runde wurden Zellen, die in diesen Fluoreszenzkanal fielen (insgesamt 4,2%), aussortiert und anschließend noch zweimal direkt resortiert. Diese Zellen ( $5 \cdot 10^5$  Ereignisse) wurden ausplattiert und gingen am nächsten Tag in die dritte Runde. Hier wurde ein signifikanter Anstieg von
- 25 Bakterien, die in den selektierten Bereich fallen, registriert (30 %). Die Zellen wurden erneut sortiert und plattiert, um am darauffolgenden Tag Einzelklone zu analysieren. 15 von 20 Einzelklonen zeigten eine Interaktion mit anti-β-Laktamase Antikörper. Aus 6 diesen Klonen wurde Plasmid-DNA isoliert und die Nukleotidsequenz des Gens für die EETI-CK-Variante bestimmt (Abb. 15).

30

Im Rahmen dieser Erfindung verwendbare Proteinsequenzen aus der Familie der Intimine sind an folgenden Stellen in der Literatur beschrieben:

- 1.) Gamma Intimin (*Escherichia coli*), NCBI GI 3941710, NCBI GI 3941712, NCBI GI 3941714, McGraw, E. A. et al. in "Molecular evolution and mosaic structure of alpha, beta, intimins of pathogenic *Escherichia coli*", *Mol. Biol. Evol.* 16(1) 12-22 (1999)
- 2.) Intimin (attaching and effacing protein, eae Protein), NCBI GI 1169452, Yu, JI and Kaper, J.B. in "Cloning and characterization of the eae gene of enterohae. *Escherichia coli* O157:H7", *Mol. Microbiol.* 6(3), 411-417 (1992)
- 3.) eae Gen, NCBI GI 384173, Beebakhee, G. et al. in "Cloning and nucleotide sequence of the eae gene homologue enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157/H7," *FEMS Microbiol. Lett.* 91(1), 63 - 68 (1992)
- 4.) Intimin (*Escherichia coli*), NCBI GI 2565325, Voss, E. et al. in "Translocated intimin receptors (Tir) of shiga-toxigenic *E. coli* isolates belonging to serogroups O26, O111, and O157 with sera from patients with hemolytic-uremic syndrome and marked sequence heterogeneity", *Infect. Immun.* 66 (11), 5580 - 5586 (1998)
- 5.) Intimin (*Escherichia coli*) NCBI GI 2865299, Elliott, S.J. et al. in "The complete sequence of the locus of enterocyte effacement from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69", *Mol. Microbiol.* 28 (1), 1-4 (1998)
- 6.) Beta Intimin (*Escherichia coli*), NCBI GI 3941718, McGraw et al.a.a.O:
- 7.) Intimin (*Escherichia coli*) NCBI GI 2739264, Deibel, D. et al. in "EspE, a novel secreted protein of attaching and effacing is directly translocated into infected host cells, where as a tyrosine-phosphorylated 90 kDa protein", *Mol. Microbiol.* 28 (3), 463-474 (1998)
- 8.) Intimin (*Escherichia coli*) NCBI GI 4388530; 9.) Intimin (*Escherichia coli*) NCBI GI 4388530; 10.) Intimin type epsilon (*Escherichia coli*) NCBI GI 6683770;
- 11.) Intimin NCBI GI 1947048; 12.) Intimin NCBI GI 4106360; 13.) Intimin (*Escherichia coli*) NCBI GI 6649538; 14.) Intimin (*Escherichia coli*) NCBI GI 2809548; 15.) Intimin (*Escherichia coli*) NCBI GI 7384863; 16.) Shares homology with the enteropathogenic *E.coli* (EPEC) coli attaching and effacing) Gene, putative NCBI GI 304362; 17.) Intimin (*Escherichia coli*) NCBI GI 7384863

**Verwendete Oligonukleotide**

Intiminup:

5'-GCGCTCTAGATAACGAGGGCAAAAAATGATTACTCATGGTTGTTATAC-3'

5

Intilo1:

5'-GCGCCAATTGCGCTGGCCTTGGTTTGATC-3'

SupE2\_Ecoup

5'-GCGCGAATTCACC AGAAAGCGTT GTACGG-3'

10

SupE2-Mlu-lo

5'-GCGCACGCGTAAGACGCGGCAGCGTCGC-3'

PMS1up

15

5'-GCGATGTTTCACCACATCG-3'

PMS1lo

5'-TCATATTTTCGTAATCCTTC-3'

20

eti-4+4up:

5'-GACGCCCGGGTGCNNSNNSNNSNNSATCCGTTGCAAACAGGACTCCG-3'

eti-4+4lo:

5'-GACGCCCGGGTGCNNSNNSNNSNNSATCCGTTGCAAACAGGACTCCG-3'

25

ML/Kol

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Präsentation von Peptiden und Proteinen auf der Oberfläche von Wirtsbakterien, wobei man (a) ein gramnegatives Wirtsbakterium bereitstellt, das transformiert ist mit einem Vektor, auf dem in operativer Verknüpfung mit einem exogen induzierbaren Promotor eine fusionierte Nukleinsäuresequenz lokalisiert ist, welche: (i) einen Sequenzabschnitt, der ein im carboxyterminalen Bereich um wenigstens die C3-Domäne verkürztes Intimin kodiert, als Verankerungsdomäne und (ii) einen für das zu präsentierende Passagierpeptid bzw. Passagierpolypeptid/protein kodierenden Nukleinsäuresequenzabschnitt aufweist, und (b) das Wirtsbakterium unter Bedingungen kultiviert, bei denen eine Expression der fusionierten Nukleinsäuresequenz und eine Präsentation des von dem Nukleinsäuresequenzabschnitt (ii) kodierten Peptids/Polypeptids/Proteins an der Oberfläche des Wirtsbakteriums erfolgt, wobei der Nukleinsäuresequenzabschnitt (ii) gegenüber dem für die Intimin-Membran-Verankerungsdomäne kodierenden Nukleinsäuresequenzabschnitt heterolog ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das verkürzte Intimin im carboxyterminalen Bereich von 280 Aminosäuren um wenigstens eine weitere der Intimin-Domänen D0, D1, D2 verkürzt ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die verwendete Intimin-Verankerungsdomäne in der äußeren Bakterienmembran aus der Gattung der Enterobacteriaceae abgeleitet wurde und in einem Wirtsbakterium einer Gattung der Enterobacteriaceae verwendet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Verankerungsdomäne ein Fragment des Intimins aus enterohämorrhagischen *E. coli* oder eine Variante davon verwendet wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass eine carboxyterminal verkürzte Variante des EaeA-Intimins aus enterohämorrhagischen *Escherichia coli* O157:H7 als Verankerungsdomäne verwendet wird.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die verkürzte Variante des EaeA Intimins die Aminosäuren 1 bis 659 beinhaltet.

7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die verkürzte Variante des EaeA Intimins die Aminosäuren 1 bis 753 beinhaltet.
8. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Expression des Fusionsgens aus dem für das verkürzte Intimin und dem für das Passagierprotein kodierenden Nukleinsäuresequenzabschnitt regulierbar ist, wobei (i) ein für ein Glutamin codierendes Codon des für das verkürzte Intimin kodierenden Nukleinsäuresequenzabschnitts durch ein *amber* Stopcodon (TAG) ersetzt ist und (ii) ein Escherichia coli Wirtsstamm verwendet wird, in dem eine Translation der mRNA des Fusionsgens durch Bereitstellung einer regulierbaren Menge an Suppressor-tRNA erfolgt, die ein Überlesen des Stopcodons bei der Translation ermöglicht.
9. Verfahren nach Anspruch 8, bei dem die Regulation der Expression des Gens für die *amber* Suppressor tRNA dadurch stattfindet, dass dieses unter Kontrolle eines in seiner Transkriptionsrate regulierbaren Promotors gesetzt wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9, bei dem der in seiner Transkriptionsrate regulierbare Promotor der PLlac-Promotor ist.
11. Verfahren zur Herstellung einer varianten Population von oberflächenexponierten Peptiden/Polypeptiden/Proteinen und zur Identifizierung von Bakterien, die Peptide/Polypeptide/Proteine mit einer jeweils gewünschten Eigenschaft tragen, wobei das Verfahren folgende Schritte aufweist: (i) Herstellen eines oder mehrerer Fusionsgene oder Fusionsgenfragmente durch Klonierung der kodierenden Sequenz eines gewünschten Passagiers im durchgehenden Leseraster mit der kodierenden Sequenz des verkürzten Intimins in mindestens einen Expressionsvektor; (ii) Variieren des Passagierpeptids durch eine der Methoden ausgewählt aus: gezielte, ortsgerichtete Mutagenese, z.B. durch Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Oligonukleotiden mit gezielt ausgetauschten Basen, durch Zufallsmutagenese unter Verwendung von Oligonukleotidgemischen mit zufallsmäßig erzeugten Basenabfolgen in ausgewählten Sequenzabschnitten in der PCR, durch error-prone PCR, zufallsgesteuerte chemische oder strahlungsgenerierte Mutagenese, (iii) Einbringen des wenigstens einen Vektors in Wirtsbakterien, die den Passagier stabil auf ihrer Oberfläche präsentieren, (iv) Exprimieren des Fusionsgens in den Wirtsbakterien, (v) Kultivierung der Bakterien zur Produktion eines stabil oberflächenexponiert präsentierten Passagiers.

12. Verfahren nach Anspruch 11, welches weiter umfasst:: (vi) selektive Anreicherung der Bakterien, die den Passagier mit den gewünschten Eigenschaften auf der Oberfläche tragen.
- 5 13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, bei dem die Identifizierung des Bakteriums, das einen Passagier mit einer gewünschten Bindungsaffinität oberflächenexponiert präsentiert, durch Bindung an einen immobilisierten oder/und markierten Bindungspartner erfolgt.
14. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, bei dem eine Population von Bakterien, welche einen Passagier mit einer Bindungsaffinität zu einem Bindungspartner oberflächenexponiert tragen, als Matrix zur Affinitäts-chromatographischen Reinigung des Bindungspartners aus einem Substanzgemisch verwendet wird.
- 10 15. Expressionsvektor für die Expression eines Fusionsgens unter der Kontrolle eines exogenen induzierbaren Promotors, in welchem in operativer Verknüpfung mit dem Promotor eine kodierende Sequenz eines gewünschten Passagierpeptids im durchgehenden Leseraster stromabwärts zu einer kodierenden Sequenz für ein im carboxyterminalen Bereich von 280 Aminosäuren um wenigstens die D3-Domäne verkürztes Intimin als Verankerungsdomäne für das Passagierpeptid vorliegt.
- 15 16. Expressionsvektor nach Anspruch 15, wobei der Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe lac-Promotor, ara-Promotor, tetA-Promotor.
17. Gramnegatives Wirtsbakterium der Gattung Enterobacteriaceae, transformiert mit wenigstens einem Expressionsvektor nach Anspruch 15.
- 20

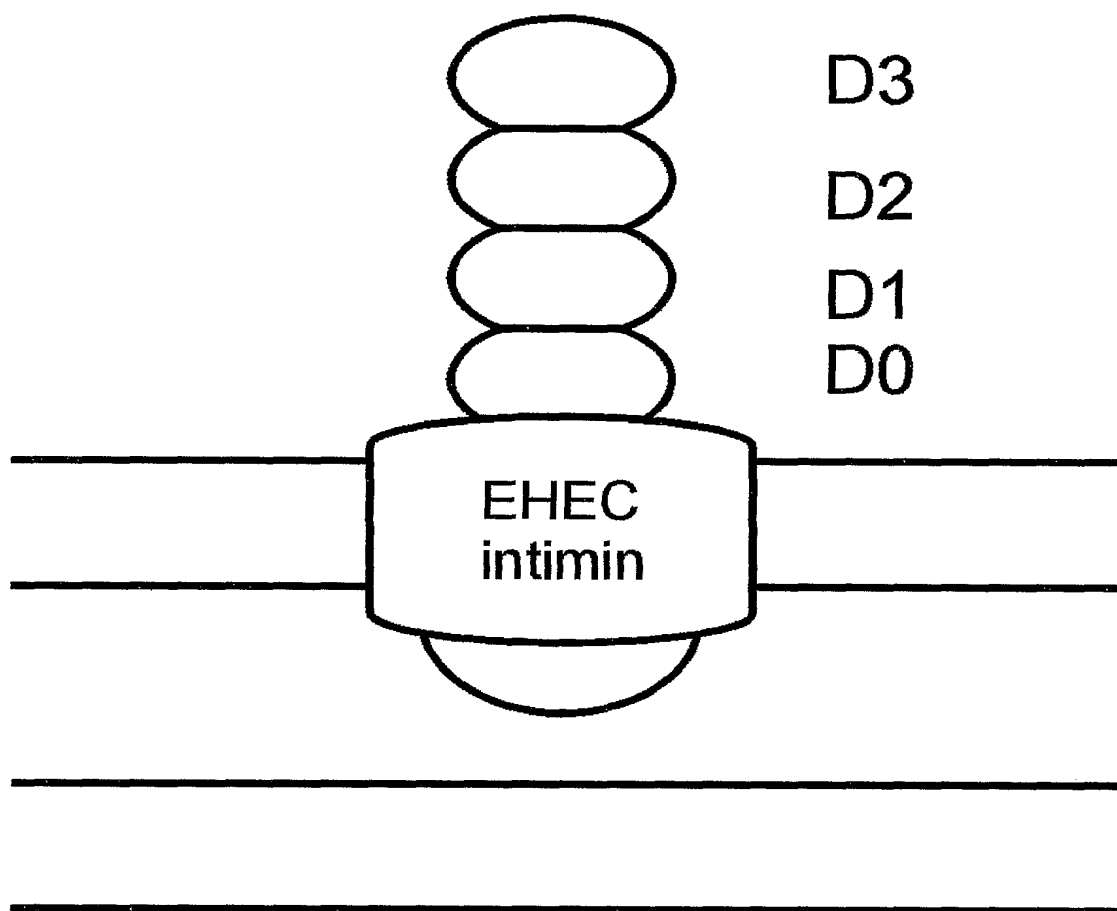


Fig.  
1

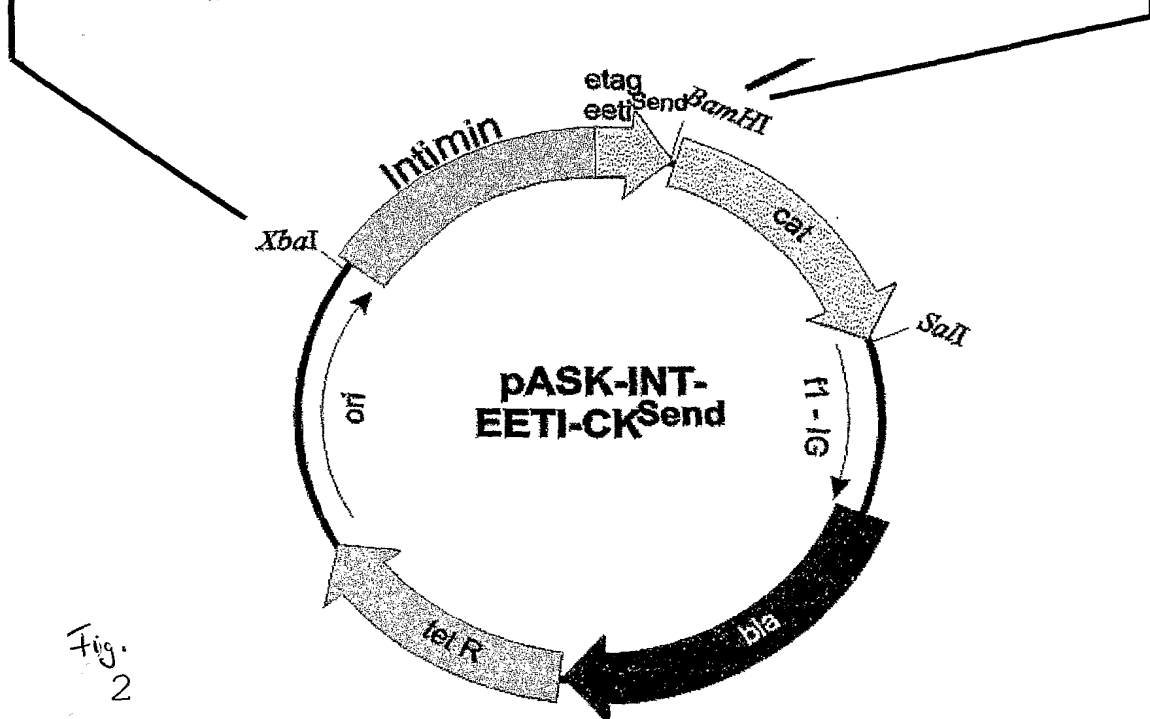
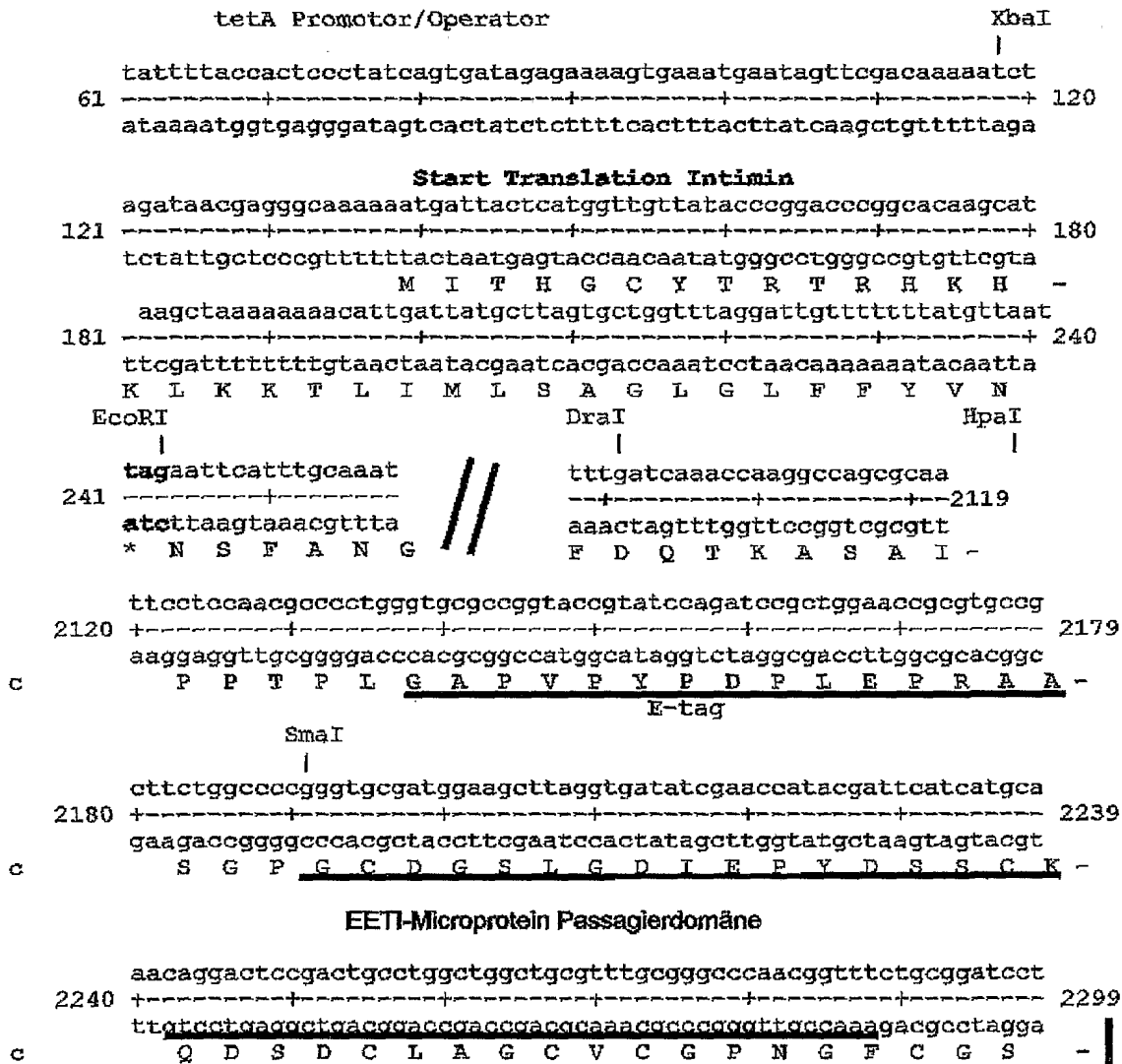


Fig. 2



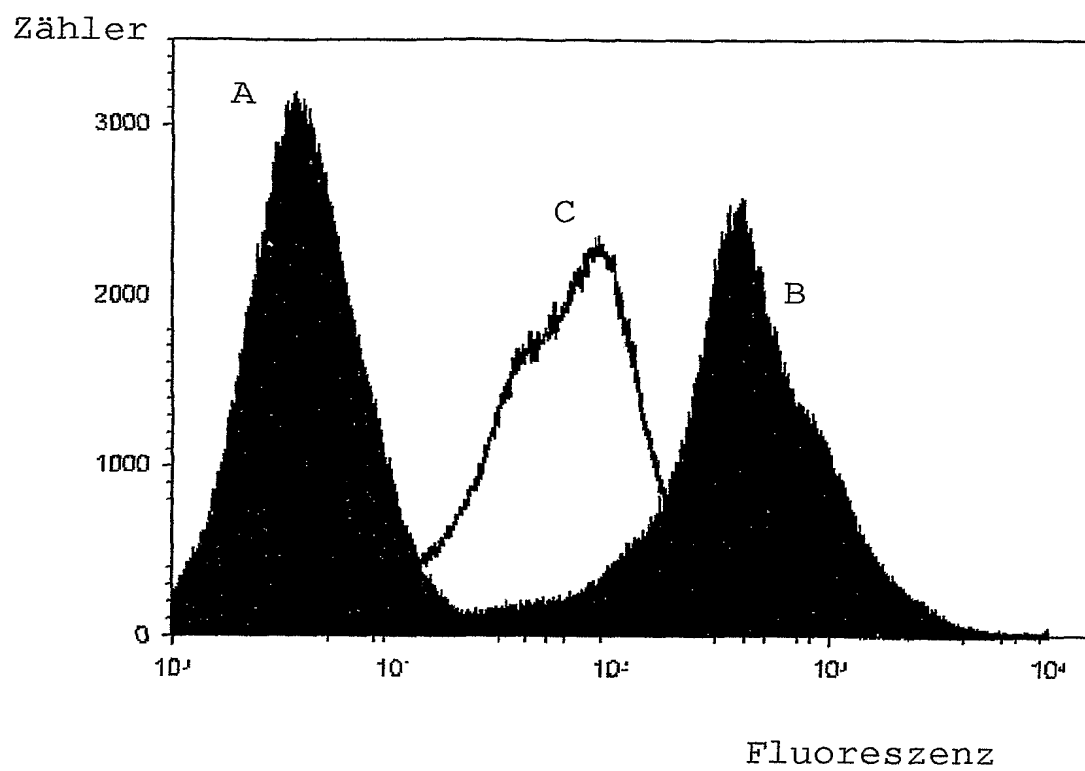


fig.  
3

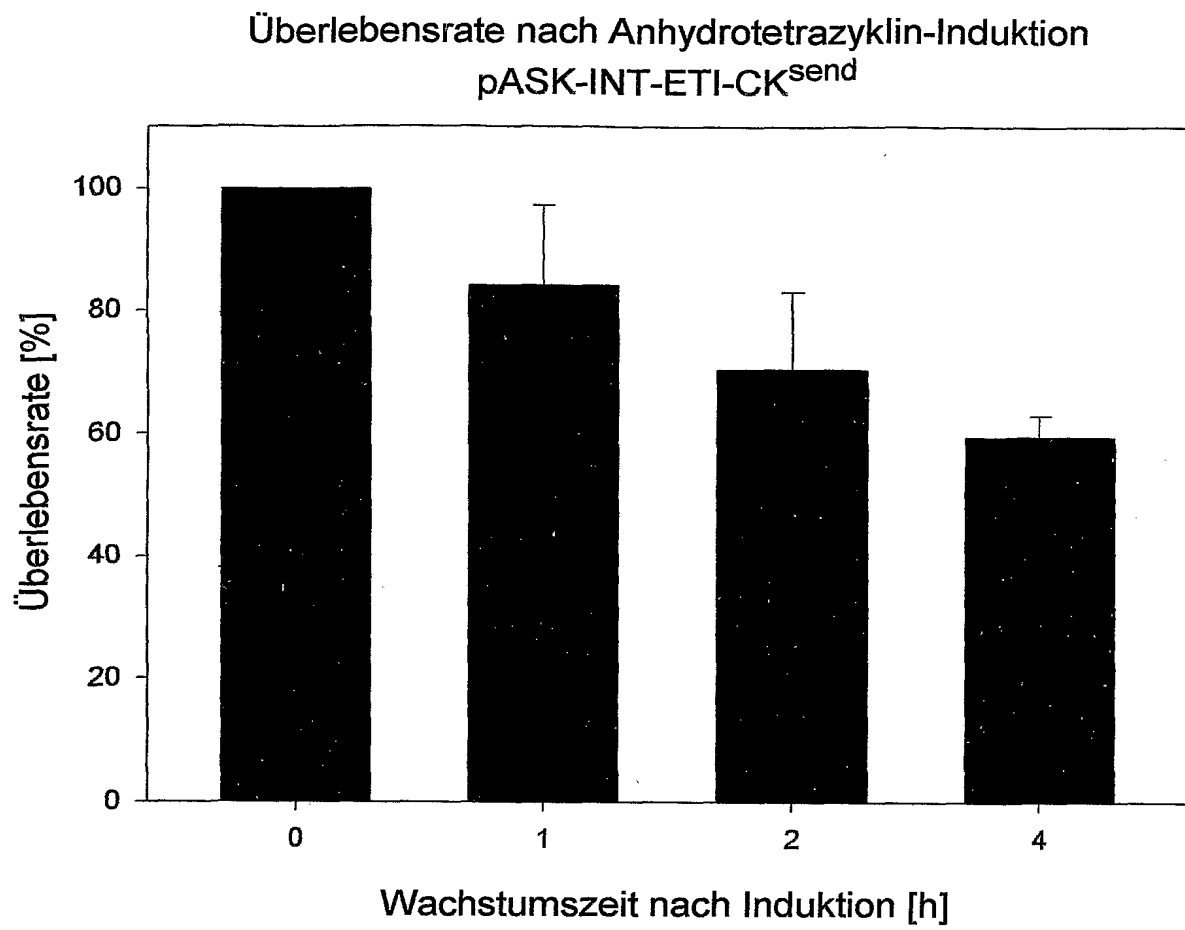


Fig. 4

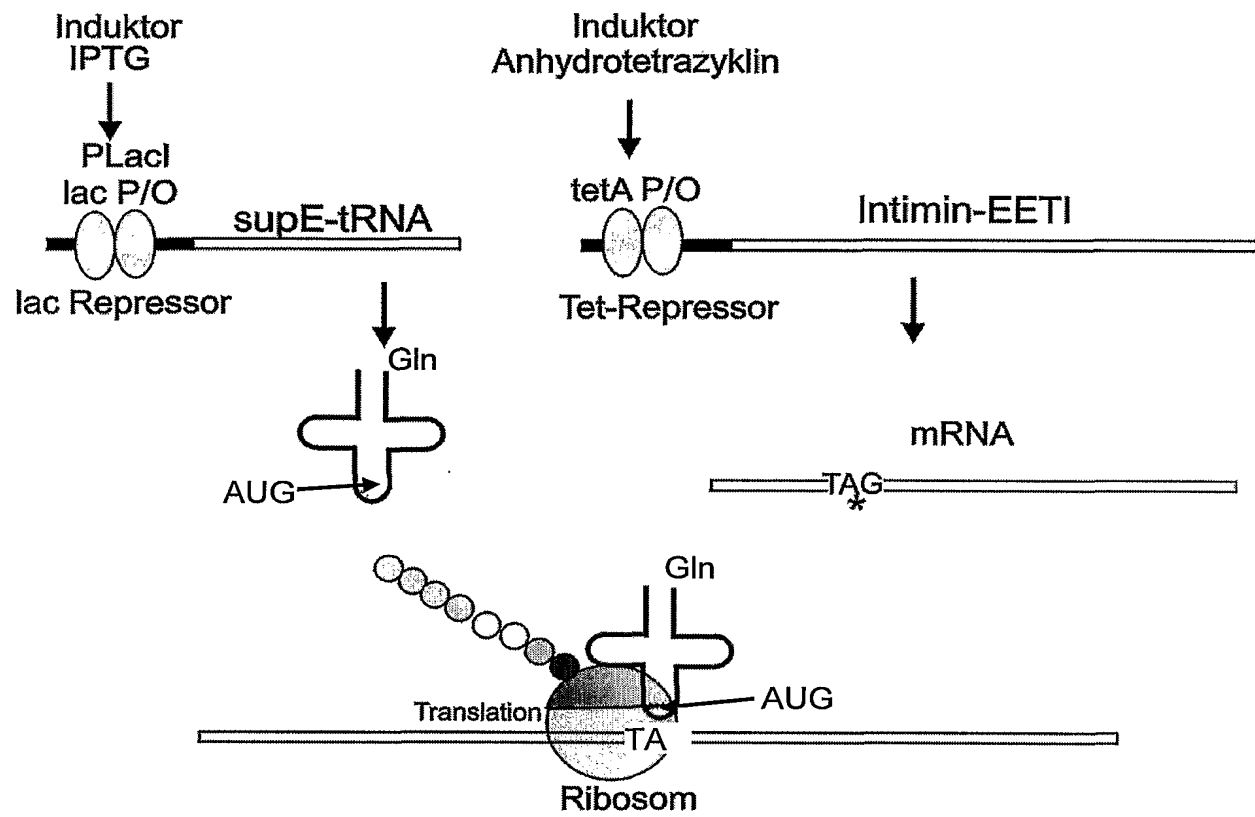


Fig. 5

SupE2\_Ecoup

GC~~GC~~GAATTCACC AGAAAGCGTT GTACGG

351 cacc agaaagcggt gtacggatgg\_ggtatcgcca agcgggtaagg  
KpnI

401 caccgggtttt tgataccggc attccctgggt tcgaatccag gtaccccccagc  
tRNA Gln (CAA)

451 catcttcttc gagtaagcgg ttcaccgccc gggtatttggg gtatcgccaa

501 gcggttaaggc accgggttttt gataccggca ttccctgggt cgaatccagg  
tRNA Gln (CCT)

551 tacc~~cc~~cagcc atcgaagaaa caatctggct acgtagctca gttgggttaga

601 gcacatcact cataatgatg gggtcacagg ttcgaatccc gtcgtagcca  
tRNA Met

651 ccaaattctg aatgtatcga atatgttcgg caaattcaaa accaatttgt

701 tgggggtatcg ccaagcggta aggcaccgga ttCTAattcc ggcattccga  
tRNA Gln (CAG)

751 ggttogaate ctcgtacccc agccaattta ttcaagacgc ttaccttgta

801 agtgcaccca gttgggggtat cgccaagcgg taaggcaccg gattctgatt

851 ccggcattcc gaggttcgaa tcctcgtacc ccagccacat taaaaaagct  
tRNA Gln (AAT)

901 cgcttcggcg agctttttgc ttttctgcgt tcattcaatg tcgaatgcga

951 tgttgacacg tcttatcctt caatgtcggg tgcgacgctgcccgttetta  
3'-CGCTGCGACGGCGCAGAATGCGCACGCG  
supE2-Mlu-10

Fig. 6a

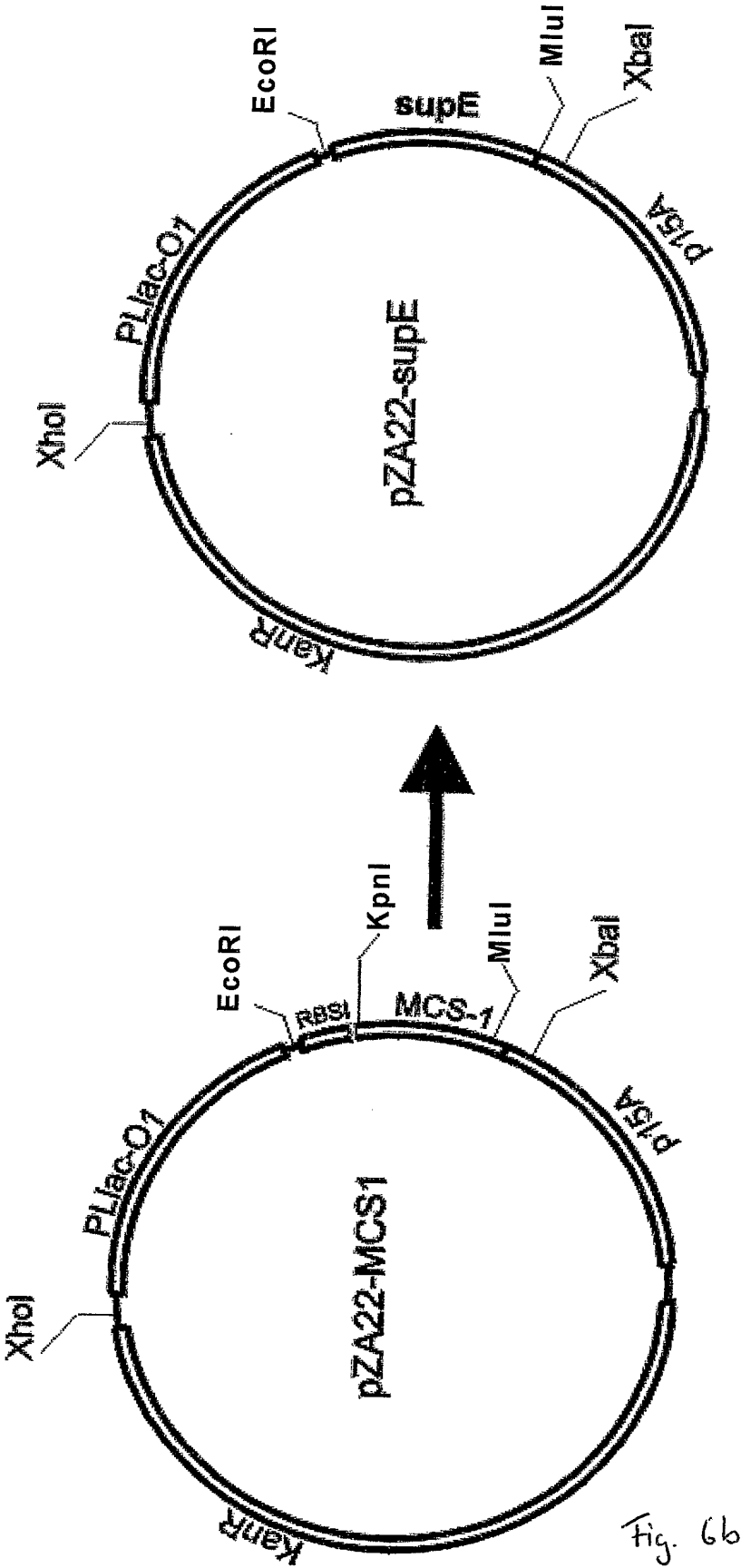


Fig. 6b

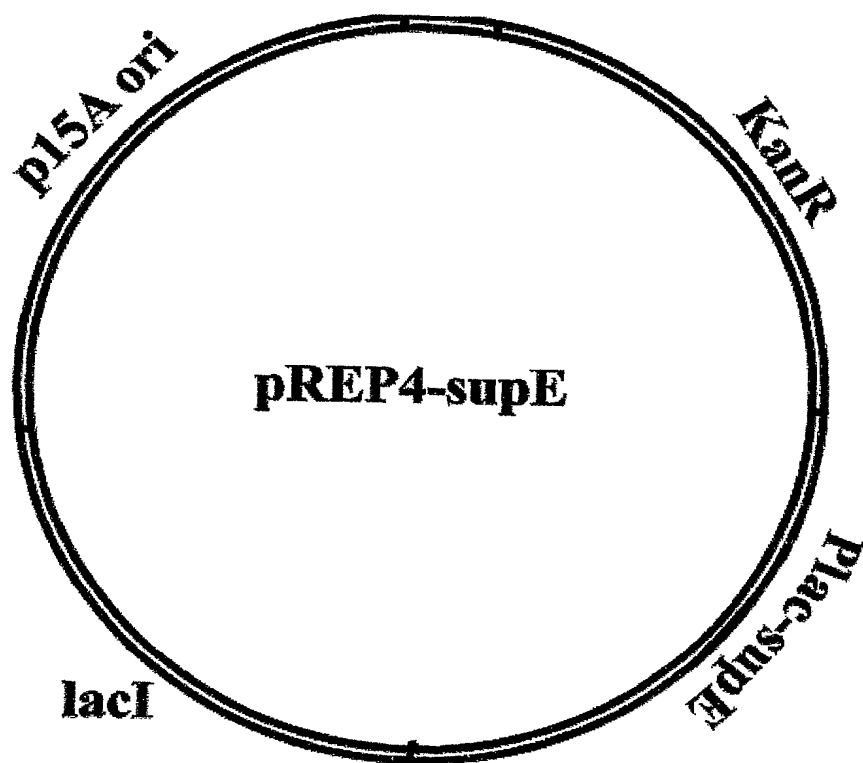


Fig. 7

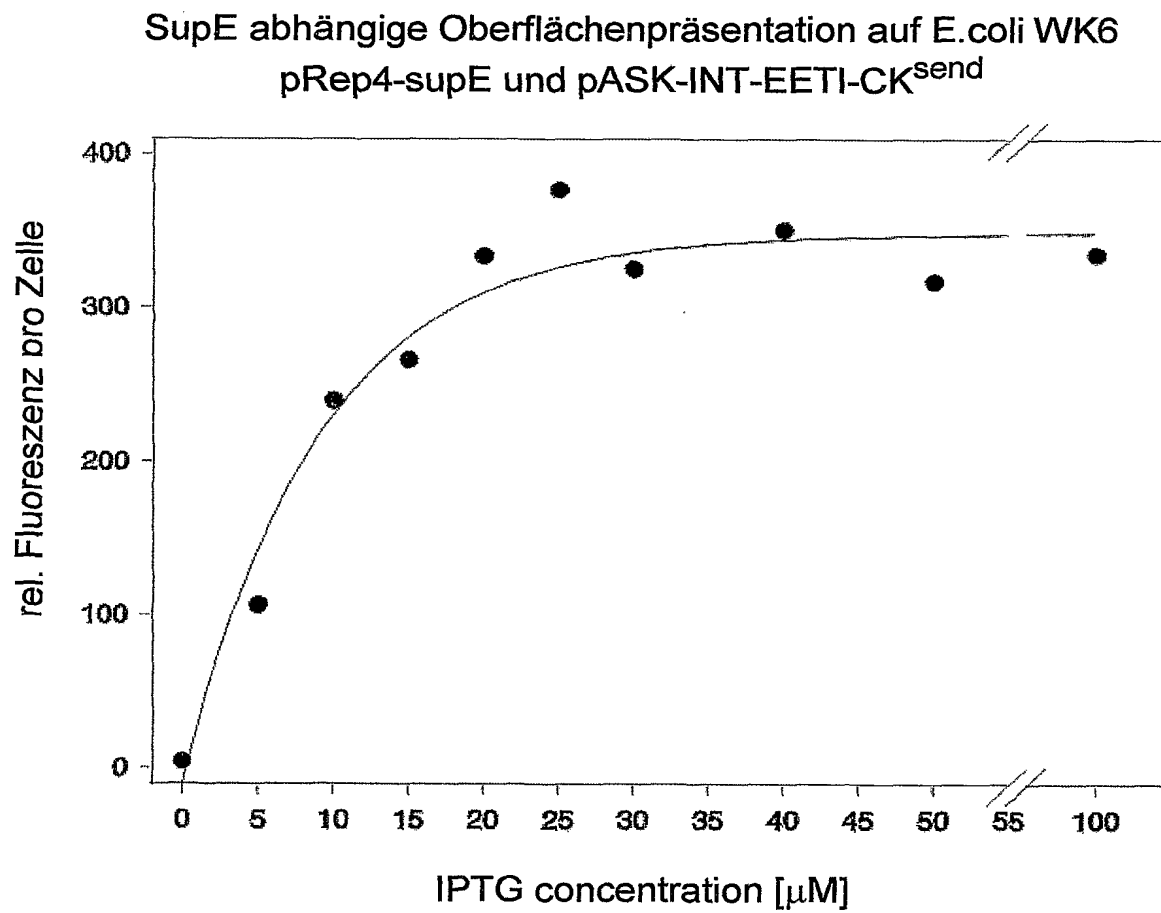


Fig. 8

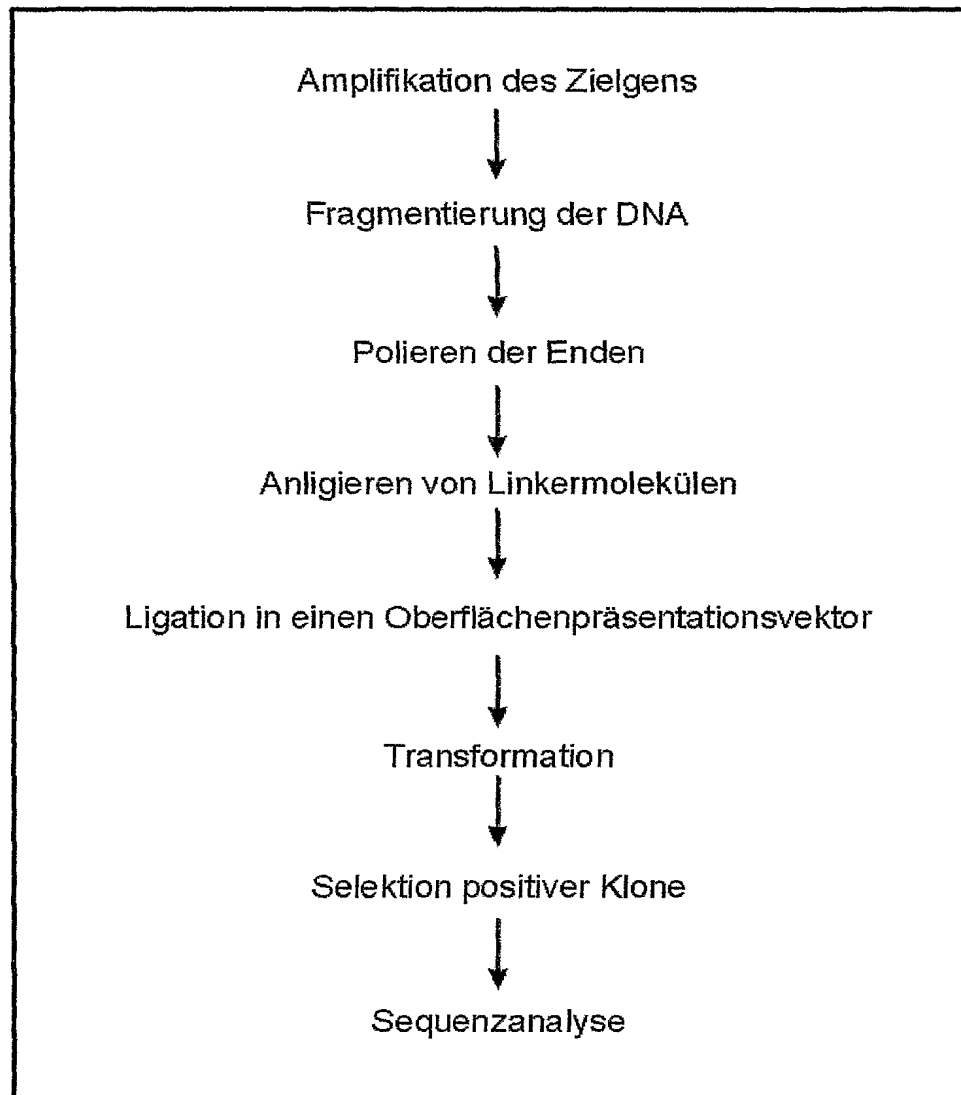


Fig. 9



CCGGGTCCGGAAGCGGTTCCGGG	TAACTGACTGACCCGCAG
CAGGCCTTCGCCAAGGCC	ATTGACTGACTGGGCGTCCTAG

Fig. 10

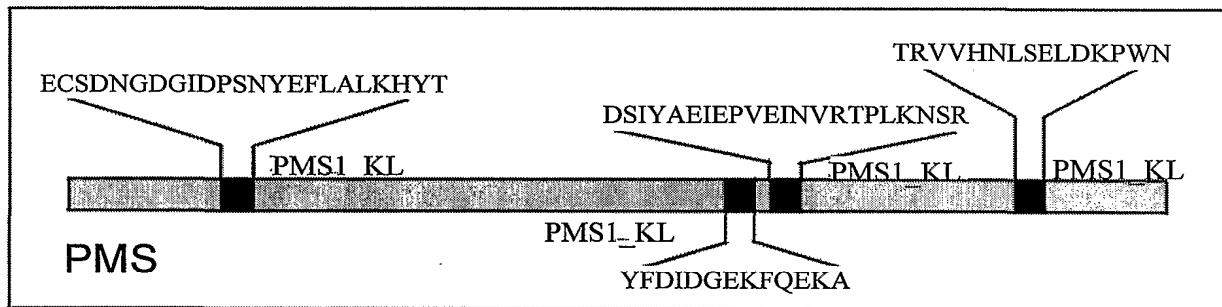
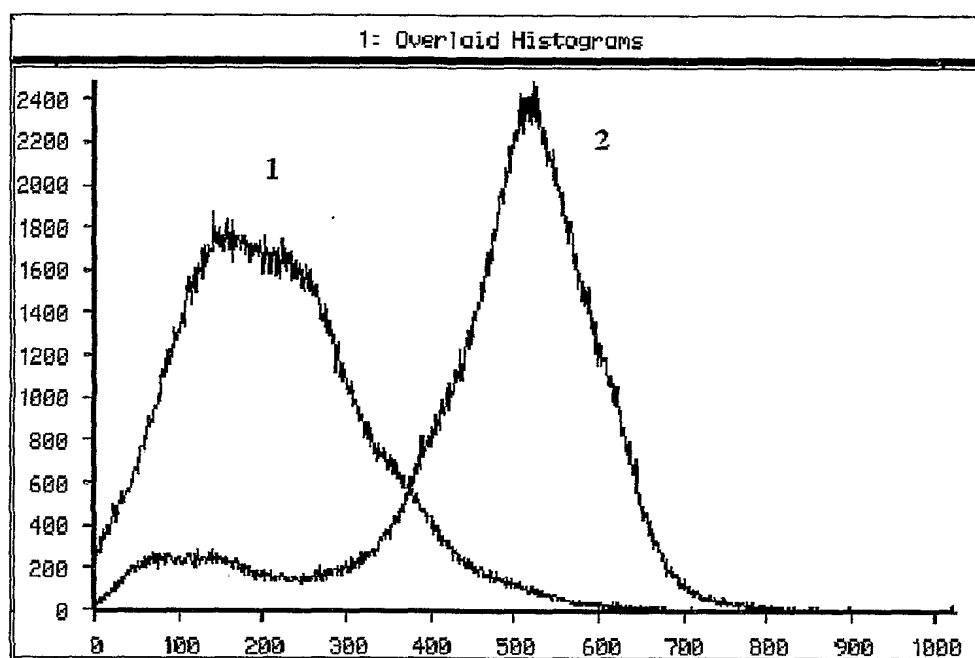
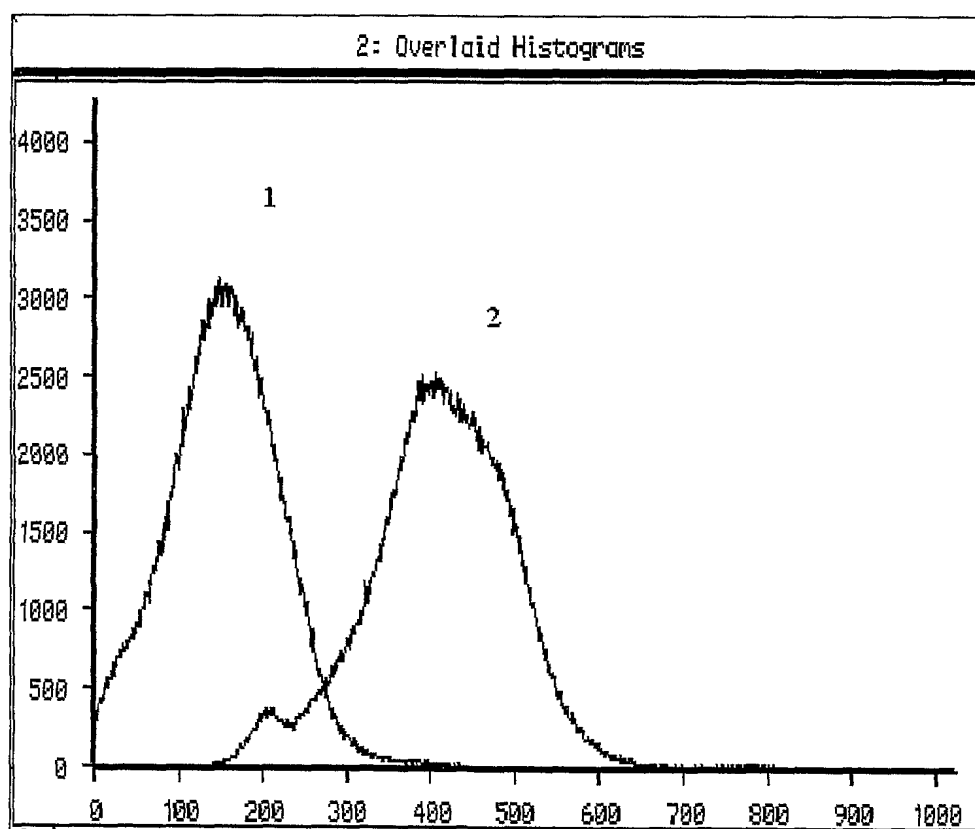


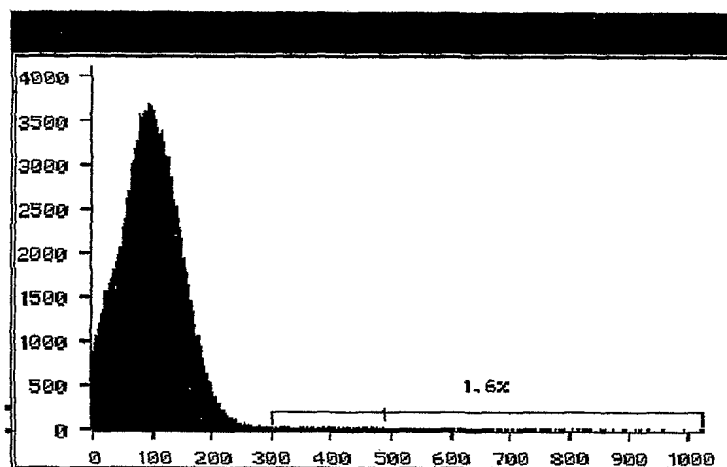
Fig. 11

GCxxxMRCKQDSDCLAGVCqv/pxxsxCG

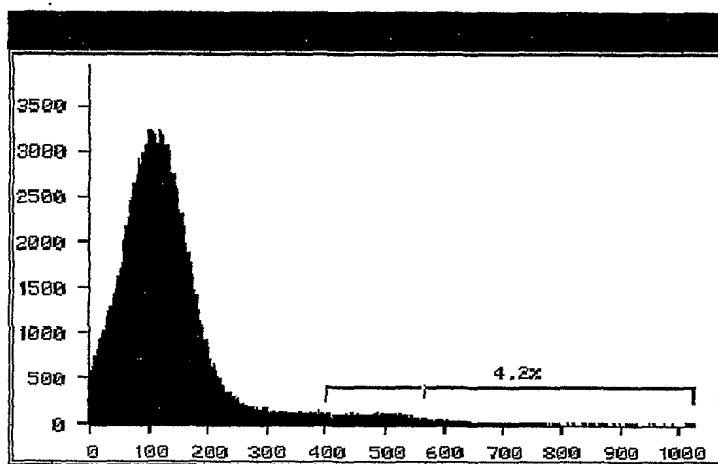
Fig. 13

12  
A)12  
B)Fig.  
12

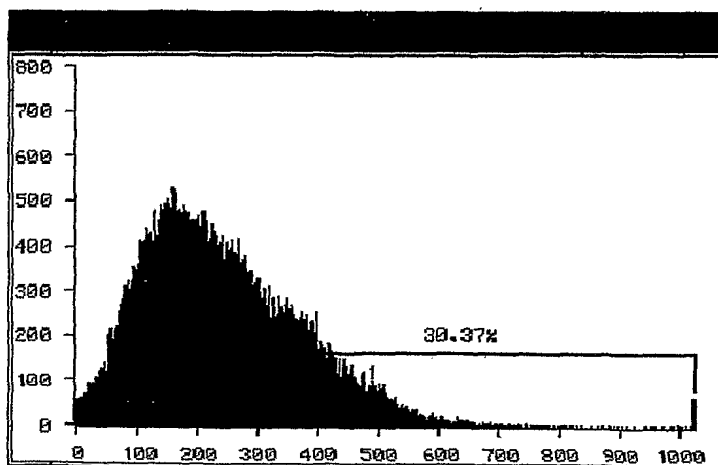
14A



14B



14C



1 GC	<b>VMTG</b>	IRCKQDS DCLAGCVCQVL	<b>NPKTSN</b>	CG
3 GC	<b>VSSH</b>	IRCKQDS DCLAGCVCQVL	<b>HPYQN</b>	CG
5 GC	<b>NRSL</b>	IRCKQDS GCLAGCVCQVL	<b>NPPTS N</b>	CG
7 GC	<b>MDTH</b>	IRCKQDS DCLAGCVCQVL	<b>NPPTS N</b>	CG
8 GC	<b>WERD</b>	IRCKQDS DCLAGCVCQVL	<b>HPSQSY</b>	CG
9 GC	<b>VTSL</b>	IRCKQDS DCLAGCVCQVL	<b>HPYYN</b>	CG

Fig. 15

**WO 02/034906 A3**



(81) **Bestimmungsstaat** (*national*): US.

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

(84) **Bestimmungsstaaten** (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

**Veröffentlicht:**

— *mit internationalem Recherchenbericht*  
— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen*

**Erklärungen gemäß Regel 4.17:**

- *hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR)*
- *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*
- *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:**

28. November 2002

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/04009

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/10 C07K14/245 C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>EP 0 872 555 A (SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES) 21 October 1998 (1998-10-21)  page 7, line 45 -page 8, line 25  page 13, line 55 -page 14, line 58; claims  7,9,15,16,18; examples 1-6</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 August 2002

Date of mailing of the international search report

17/09/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

ALCONADA RODRIG., A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/04009

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHRISTMANN ANDREAS ET AL: "The cystine knot of a squash-type protease inhibitor as a structural scaffold for Escherichia coli cell surface display of conformationally constrained peptides" PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 12, no. 9, 1999, pages 797-806, XP002175661 ISSN: 0269-2139 cited in the application page 800, left-hand column, paragraph 2 -page 801, left-hand column, paragraph 1 page 803, left-hand column, paragraph 3 -right-hand column, paragraph 1 ---	1-17
A	SCHEMBRI & KLEMM: "Heterobinary adhesins based on the Escherichia coli FimH fimbrial protein" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 64, no. 5, May 1998 (1998-05), pages 1628-1633, XP002109166 ISSN: 0099-2240 abstract ---	1-17
P,X	DATABASE 'Online! 11 October 2001 (2001-10-11) KOLMAR, H.: "pASKInt100 - Expression vector for surface display of Intimin fusion proteins" retrieved from WWW.GWDG.DE/{HKOLMAR/PASKINT100.HTM XP002211330 the whole document ---	1-6, 8-10, 15-17
T	CHRISTMANN A ET AL: "Epitope mapping and affinity purification of monospecific antibodies by Escherichia coli cell surface display of gene-derived random peptide libraries" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 257, no. 1-2, 1 November 2001 (2001-11-01), pages 163-173, XP004311948 ISSN: 0022-1759 --- -/--	1-17



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/04009

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>WENTZEL ALEXANDER ET AL: "Display of passenger proteins on the surface of Escherichia coli K-12 by the enterohemorrhagic E. coli intimin EaeA." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 183, no. 24, December 2001 (2001-12), pages 7273-7284, XP002211329 ISSN: 0021-9193</p> <p>-----</p>	1-17

### Information on patent family members

PCT/DE 01/04009

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
EP 0872555	A	21-10-1998	EP WO	0872555 A1 9706264 A1	21-10-1998 20-02-1997

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/10 C07K14/245 C12N5/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 872 555 A (SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES) 21. Oktober 1998 (1998-10-21) Seite 7, Zeile 45 -Seite 8, Zeile 25 Seite 13, Zeile 55 -Seite 14, Zeile 58; Ansprüche 7,9,15,16,18; Beispiele 1-6 --- -/--	1-17



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*&amp;\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. August 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

17/09/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

ALCONADA RODRIG..., A

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>CHRISTMANN ANDREAS ET AL: "The cystine knot of a squash-type protease inhibitor as a structural scaffold for Escherichia coli cell surface display of conformationally constrained peptides" PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 12, Nr. 9, 1999, Seiten 797-806, XP002175661  ISSN: 0269-2139  in der Anmeldung erwähnt  Seite 800, linke Spalte, Absatz 2 -Seite 801, linke Spalte, Absatz 1  Seite 803, linke Spalte, Absatz 3 -rechte Spalte, Absatz 1</p> <p>---</p>	1-17
A	<p>SCHEMBRI &amp; KLEMM: "Heterobinary adhesins based on the Escherichia coli FimH fimbrial protein" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, Bd. 64, Nr. 5, Mai 1998 (1998-05), Seiten 1628-1633, XP002109166  ISSN: 0099-2240  Zusammenfassung</p> <p>---</p>	1-17
P, X	<p>DATABASE 'Online!  11. Oktober 2001 (2001-10-11)  KOLMAR, H.: "pASKInt100 - Expression vector for surface display of Intimin fusion proteins"  retrieved from  WWW.GWDG.DE/{HKOLMAR/PASKINT100.HTM  XP002211330  das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-6, 8-10, 15-17
T	<p>CHRISTMANN A ET AL: "Epitope mapping and affinity purification of monospecific antibodies by Escherichia coli cell surface display of gene-derived random peptide libraries" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, Bd. 257, Nr. 1-2, 1. November 2001 (2001-11-01), Seiten 163-173, XP004311948  ISSN: 0022-1759</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-17

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
T	<p>WENTZEL ALEXANDER ET AL: "Display of passenger proteins on the surface of Escherichia coli K-12 by the enterohemorrhagic E. coli intimin EaeA." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 183, Nr. 24, Dezember 2001 (2001-12), Seiten 7273-7284, XP002211329 ISSN: 0021-9193</p> <p>-----</p>	1-17

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/04009

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0872555 A	21-10-1998	EP 0872555 A1 WO 9706264 A1	21-10-1998 20-02-1997
<hr/>			